

METHODEN ZUM NACHWEIS HYDROPHILER UND
FARBIGER ZUCKERUMWANDLUNGSPRODUKTE

JOSEF WERNER HIEBL

*Duss
München
1904*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Methoden zum Nachweis hydrophiler und farbiger
Zuckerumwandlungsprodukte

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Josef Werner Hiebl
aus Oberhaching
München 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-D. Stachel

Der Fakultät eingereicht am: 10.1.1984

Tag der mündlichen Prüfung : 22.2.1984

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie
und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität
München auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

angefertigt. Für seine großzügige Unterstützung und stets
wohlwollende Hilfe möchte ich Herrn Professor Severin mei-
nen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Dr. F. Ledl gilt mein Dank für seine wertvollen
Anregungen und die stets freundliche Diskussionsbereitschaft.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil

	Seite
Einleitung	1
A) Analytik der niedermolekularen, hydrophilen Zucker-	
abbauprodukte	3
1. Einführung	3
2. Derivatisierung alkoholischer OH-Gruppen	6
3. Neuere Zucker-Derivatisierungsverfahren	11
4. Umsetzung von Zuckerspaltprodukten zu Oximacetaten	13
5. Bildung der O-Methyloximacetate von Zuckern und	
wichtigen Abbauprodukten	19
6. Nachweis der Zuckerspaltprodukte in Bräunungs-	
ansätzen	22
a. Trockenes Erhitzen von Glucose und Fructose	22
b. Trockenes Erhitzen von Fructose unter Zusatz	
von Natriumcarbonat	25
c. Umsetzung von Glucose und Fructose unter	
Bedingungen der Maillard-Reaktion	27
d. Untersuchung von Brezenkruste	29
7. Nachweis weiterer Zuckerumwandlungsprodukte	30
a. Nachweis durch Herstellung von Vergleich-	
substanzen	30
b. Nachweis durch GC-Splitting	31
c. Strukturhinweise durch GC/MS-Analyse	32

B) Nachweis von Reduktionen	35
1. Einführung	35
2. Nachweisverfahren mit Methylhydrazin	39
3. Nachweis von C4-Aminoredukten	40
4. Nachweis von Diacetylformoin	41
C) Strukturaufklärung farbiger Substanzen	46
1. Einführung	46
2. Farbige Verbindungen aus Hexosen	50
3. Farbige Verbindungen aus Pentosen	52
4. Umsetzung von Xylose mit Glycin	55
5. Umsetzung von Glucose mit Glycin	66
6. Synthese der farbigen Hexoseprodukte	71
7. Diskussion	74
Zusammenfassung	77

Experimenteller Teil

Allgemeine Methoden	80
A) Analytik der niedermolekularen, hydrophilen Zucker- abbauprodukte	81
1. Acetylierung	81
2. Allgemeine Vorschrift für die Umsetzung von Hydro- xyaldehyden- und ketonen zu O-Alkyloximacetaten	83
3. Herstellung von <u>27</u>	87
4. Herstellung von <u>35</u>	87

5. Herstellung von <u>28</u>	88
6. Bräunungsansätze	89
6.1. Karamelisierung von Glucose und Fructose	89
6.2. Trockenes Erhitzen von Fructose unter Basen- zusatz	89
6.3. Umsetzung von Fructose und Glucose unter Bedingungen der Maillard-Reaktion	90
7. Untersuchung von Brezenkruste	91
8. Herstellung von <u>37</u>	92
9. Isolierung der beiden Hauptprodukte des Glucose- karamels	92
10. Methylierung der O-Methyloxime von Fructose und Hydroxymethylfurfurol und des Dihydroxyaceton- O-Benzylloxims	94
11. Herstellung des Dimethoxyaceton-O-Benzylloxims aus <u>21</u> durch Phasentransfer	95
B) Nachweis von Reduktionen	96
1. Nachweis des C4-Aminoreduktions in Zucker/ Aminosäure-Bräunungsgemischen	96
1.1. Allgemeine Vorschrift	96
1.2. Umsetzung in alkalischer Lösung	97
1.3. Trockener Bräunungsansatz	97
2. Nachweis des C4-Aminoreduktions in dunklem Malz	97
3. Umsetzung von Diacetylformoin zu <u>47a/b</u> und <u>48</u>	98

4. Nachweis des Diacetylformoins	99
4.1. Nachweis in einem Fructose/Glycin-Bräunungs- gemisch	99
4.2. Nachweis in Brezenkruste	99
4.3. Nachweis in dunklem Malz	99
 C) Strukturaufklärung farbiger Substanzen	
1. Isolierung von <u>63a/b</u>	100
2. Synthese von <u>61a</u>	101
3. Isolierung von <u>69a/b</u>	102
4. Synthese von <u>69a/b</u>	103
5. Synthese von <u>74</u>	104
6. Isolierung von <u>74</u>	105
7. Umsetzung von Rhamnose mit Glycin und Furfurol	106
 Literaturverzeichnis	107
 Lebenslauf	110

Theoretischer Teil

Einleitung

Die bei der Hitzebehandlung von Lebensmitteln häufig auftretenden Bräunungsreaktionen sind seit Anfang dieses Jahrhunderts Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. L.C. Maillard¹ konnte im Jahr 1912 erstmals zeigen, daß die Bildung der braunen Pigmente, Melanoidine genannt, im wesentlichen auf Reaktionen von reduzierenden Zuckern mit Proteinen zurückzuführen ist. Da neben der allmählichen Farbvertiefung die Bildung von Aroma- und Geschmacksstoffen, sowie von Substanzen mit antioxidativer Wirkung erfolgt, besitzt die "Maillard-Reaktion" entscheidende Bedeutung beim Zubereiten von Lebensmitteln durch Backen, Braten und Rösten. Negativ macht sich diese auch als "nichtenzymatische Bräunung" bezeichnete Reaktion häufig bei der Haltbarmachung und Lagerung von Lebensmitteln bemerkbar, wobei unerwünschte Verfärbungen und Geschmacksveränderungen technologische Probleme aufwerfen können. In ernährungsphysiologischer Hinsicht interessant ist die durch den Abbau essentieller Aminosäuren bedingte Minderung des Nährwertes. Außerdem mehren sich in letzter Zeit die Befunde über die mutagene Wirkung von Substanzen aus der Kruste thermisch stark belasteter Lebensmittel (Brot, gebratenes Fleisch)², wie auch von Zucker/Aminosäure-Bräunungsgemischen³. Aus diesen Gründen erscheint eine Aufklärung der unter Hitzeeinwirkung ablaufenden Prozesse wünschenswert. Durch die Un-

tersuchung von vereinfachten Modellansätzen anstelle der äußerst komplexen Lebensmittel konnten in den letzten Jahren wichtige Reaktionswege aufgezeigt und zahlreiche Zuckerabbauprodukte identifiziert werden. Diese lassen sich in drei Kategorien einteilen:

1) niedermolekulare, flüchtige Substanzen

Sie wurden eingehend analysiert, da sie als Aromakomponenten von großem Interesse sind. Über GC/MS-Kopplung gelang es, mehrere hundert Substanzen nachzuweisen und zu identifizieren.

2) niedermolekulare, hydrophile Substanzen

Ihre Strukturen sind nur teilweise aufgeklärt, da Nachweis bzw. Isolierung erheblich größere Schwierigkeiten bereiten.

3) höhermolekulare und farbige Substanzen

Über die Strukturen der braunen Makromoleküle ist sehr wenig bekannt. Die Isolierung und Strukturaufklärung gelber Verbindungen aus Zucker/Aminosäureansätzen gelang erstmals Severin und Krönig^{4,5}. Inzwischen konnten noch einige weitere farbige Substanzen identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, geeignete Nachweismethoden für Substanzen der zweiten und dritten Kategorie zu entwickeln und damit eventuell neue Strukturen aufzuklären.

A) Analytik der niedermolekularen, hydrophilen Zuckerabbauprodukte

1. Einführung

Zucker können thermisch unter verschiedenen Bedingungen abgebaut werden. Man unterscheidet im wesentlichen vier Umsetzungstypen:

- trockenes Erhitzen (Karamelisierung)
- Einwirkung von Säuren
- Einwirkung von Basen
- Reaktion mit Aminen oder Aminosäuren (Maillard-Reaktion)

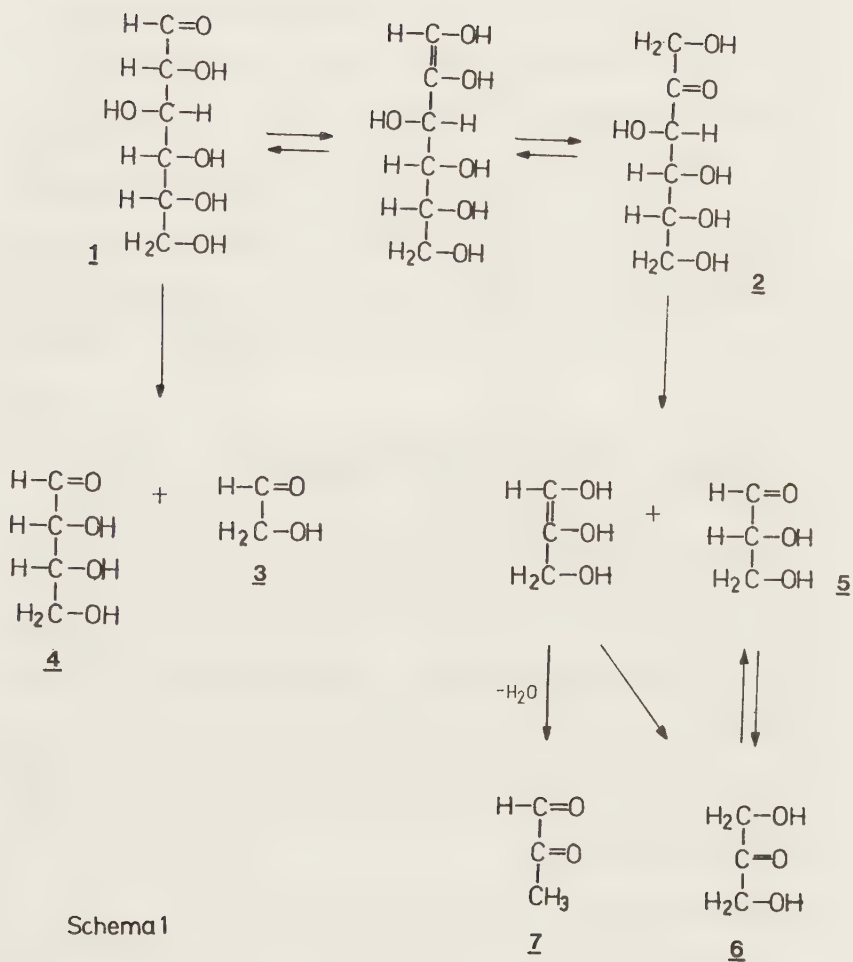
Je nach Reaktionsbedingungen kann die Bildung von Zuckerabbauprodukten qualitativ und quantitativ sehr unterschiedlich sein. Der Anteil an Substanzen, die sich mit organischen Lösungsmitteln extrahieren lassen, ist stets gering. Da die niedermolekularen unter ihnen flüchtig und deshalb relativ leicht durch GC/MS-Kombination nachweisbar sind, machen diese Verbindungen dennoch mehr als 90% der bekannten Zuckerumwandlungsprodukte aus. Nur unzureichend kennt man dagegen die Strukturen der hydrophilen Substanzen, die zwar mengenmäßig bei weitem überwiegen, jedoch wesentlich schwerer nachzuweisen sind. Neben einem Großteil der hochmolekularen Melanoidine gehören u. a. auch niedermolekulare Spaltprodukte zu dieser Gruppe.

Schon lange bekannt ist die sowohl durch Säuren, vor allem

aber durch Basen katalysierte Retroaldolreaktion von Mono-sacchariden, die C₂- bis C₄-Bruchstücke liefert. Aus D-Glucose (1) können auf diesem Weg Glykolaldehyd (3) und D-Erythrose (4) entstehen; aus D-Fructose (2) bilden sich entsprechend D-Glycerinaldehyd (5) und Dihydroxyaceton (6)⁶, sowie durch Wasserabspaltung Methylglyoxal (7)⁷. Dabei ist oft nicht entscheidend, ob man von Glucose oder Fructose ausgeht, da sich beide über die Enolform ineinander umwandeln können. Ähnlich leicht erfolgt die Isomerisierung des Glycerinaldehyds über die sog. Lobry de Bruyn-van Ekenstein-Umlagerung zum Dihydroxyaceton.

Glykolaldehyd, Dihydroxyaceton, Glycerinaldehyd und Erythrose weisen als Hydroxycarbonylverbindungen die charakteristischen Zuckermerkmale auf. Ihr Reaktionsvermögen ist im Vergleich zu dem der Hexosen erheblich größer. Es gibt Hinweise dafür, daß sie an der Aroma- und Melanoidinbildung in Lebensmitteln beteiligt sind^{8,9}. Dihydroxyaceton wird in kosmetischen Präparaten zur Bräunung der Haut verwendet. Vermutlich reagiert es dabei bevorzugt mit der Aminogruppe der Lysinseitenkette in Hautproteinen. Noch wesentlich kondensationsfreudiger ist das Methylglyoxal, dem aus diesem Grund eine wichtige Rolle bei der Bräunung von Lebensmitteln (z.B. Fischräucherung) zugeschrieben wird¹⁰.

Da diese Zuckerspaltprodukte zum Teil sehr reaktiv (Glykolaldehyd, Methylglyoxal), zum Teil polar und kaum flüchtig



Schema 1

sind (Dihydroxyaceton, Glycerinaldehyd, Erythrose), erweist sich ihre Isolierung aus einem komplexen Reaktionsgemisch als schwierig. Es gibt zwar analytische Verfahren, mit denen man Einzelsubstanzen erfassen kann (z.B. enzymatische Bestimmung von Dihydroxyaceton¹¹), jedoch ist keine Methode beschrieben, die den Nachweis mehrerer Produkte nebeneinander erlaubt. Durch geeignete Derivatisierung sollte dies gaschromatographisch möglich sein. Ich untersuchte deshalb, inwieweit sich Derivatisierungsverfahren, die in der Zuckeranalytik gebräuchlich sind, auch auf Abbauprodukte anwenden lassen.

2. Derivatisierung alkoholischer OH-Gruppen

Monosaccharide lassen sich nach vollständiger Derivatisierung der OH-Gruppen gut gaschromatographisch bestimmen. Über diesen Weg sollten auch 4, 5 und 6, sowie noch andere polare, niedermolekulare Zuckerumwandlungsprodukte nachweisbar sein.

Für ein komplexes Bräunungsgemisch ist ein Derivatisierungsverfahren nur dann geeignet, wenn es weitgehend folgende Voraussetzungen erfüllt:

- Bildung stabiler, leichtflüchtiger Derivate
- vollständige Derivatisierung sämtlicher Alkoholfunktionen
- keine Beeinträchtigung des Derivatisierungsvorganges durch

geringe Mengen Wasser (diese befinden sich stets in Bräunungsgemischen

- keine Reaktion mit anderen funktionellen Gruppen (z.B. Carbonylfunktionen), da sonst Kunstprodukte entstehen.
- Bildung von Derivaten mit leicht interpretierbaren MS-Spektren, so daß über GC/MS-Analyse Hinweise auf die Strukturen unbekannter Substanzen erhalten werden können.

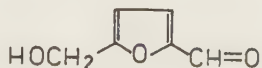
Unter diesen Gesichtspunkten wurden die wichtigsten Derivatisierungsmöglichkeiten von Alkoholen, Silylierung, Methylierung und Acetylierung, untersucht.

Silylierung

Die Silylierung ist eine ausgezeichnete Methode zur Derivatisierung von wasserfreien Alkoholen. Die Anwendung auf ein wasserhaltiges Reaktionsgemisch ist jedoch nur schlecht möglich, da Silylether meist hydrolyseempfindlich sind.

Methylierung

Nahezu alle gängigen Methylierungsverfahren werden unter Basenzusatz durchgeführt. Die Untersuchungen von Rothmoser¹² zeigten, daß sich unter diesen Bedingungen sogar relativ stabile Zuckermwandlungsprodukte wie Hydroxymethylfurfural (8) zersetzen.

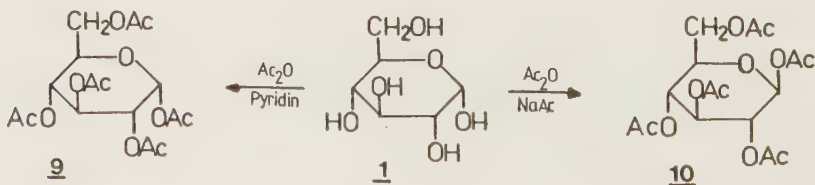


8

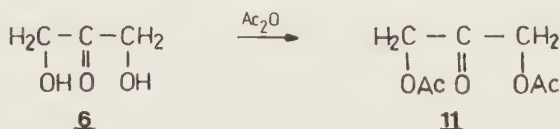
Ich versuchte, Dihydroxyaceton mit Methyljodid und Natriumhydrid als Base zu methylieren und konnte ebenfalls eine Dunkelfärbung der Lösung, sowie die Bildung mehrerer Zersetzungsprodukte beobachten. Die meisten Abbauprodukte weisen ebenso wie die Zucker selbst Carbonylfunktionen auf, so daß bei Zusatz einer starken Base vermutlich Kondensationsreaktionen in den Vordergrund traten. Unter sauren Bedingungen lassen sich Alkohole mit Diazomethan und Bortrifluorid methylieren. Doch auch diese Methode führt bei Mailardprodukten zu Zersetzungsreaktionen¹².

Acetylierung

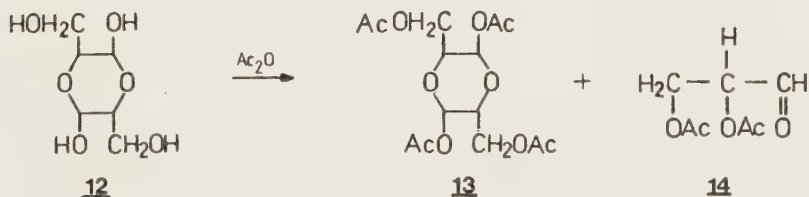
Die OH-Gruppen von Kohlenhydraten reagieren mit Acetanhydrid in Gegenwart von basischen oder sauren Katalysatoren. Für die Peracetylierung von Glucose verwendet man meist Pyridin oder Natriumacetat. Aus α -D-Glucose entsteht unter Pyridin-Katalyse überwiegend das α -D-Glucopyranosepentaacetat (9), mit Natriumacetat als Katalysator dagegen das β -D-Glucopyranosepentaacetat (10)¹³. 9 und 10 lassen sich im NMR-Spektrum eindeutig an der chemischen Verschiebung und an der Kopplungskonstante des C1-Prottons unterscheiden¹⁴.



Beide Derivatisierungsvarianten lieferten die flüchtigen Pentaacetylverbindungen in nahezu quantitativer Ausbeute. Dagegen erwiesen sich die entsprechenden Umsetzungen von Fructose als ungeeignet für analytische Zwecke. Gaschromatographisch war die Bildung einer Reihe von Nebenprodukten zu beobachten. In der Literatur wird für die Peracetylierung von Fructose ZnCl_2 als Katalysator vorgeschlagen. Jedoch liegen auch bei dieser Methode die Ausbeuten unter 50%. Dihydroxyaceton ließ sich mit Acetanhydrid und Natriumacetat gut zum Bisacetylprodukt (11) umsetzen.



Dagegen erhielt ich aus Glycerinaldehyd unter gleichen Bedingungen nur zum geringen Teil das entsprechende Derivat 14. Das Hauptprodukt ist eine wesentlich schwerer flüchtige Substanz, für die in der Literatur Struktur 13 angegeben wird¹⁵.



Der Grund für die Bildung dieses dimeren Produktes liegt darin, daß der Glycerinaldehyd nicht in freier Form, sondern stabilisiert als dimeres cyclisches Halbacetal 12 vorliegt und reagiert. Um eine einheitliche Derivatisierung zu erreichen, muß die Halbacetalstruktur aufgehoben werden. Somit ergibt sich eine ähnliche Problematik wie bei der Derivatisierung von Hexosen. Diese liegen praktisch nur in der cyclischen Halbacetalform vor. Fructose z.B. bildet in Lösung sowohl einen Furan- als auch einen Pyranring. Da durch die Cyclisierung jeweils ein weiteres Asymmetriezentrum entsteht, ergeben sich insgesamt vier diastereomere Formen, die durch Derivatisierung fixiert werden. Bei guter gaschromatographischer Auftrennung kann somit ein Zucker bis zu vier Peaks liefern. Um dies zu verhindern, wird in neueren Zucker-Derivatisierungsverfahren zunächst durch Blockierung der Carbonylgruppe die offenkettige Form hergestellt; dann erst erfolgt die Derivatisierung der OH-Gruppen.

3. Neuere Zucker-Derivatisierungsverfahren

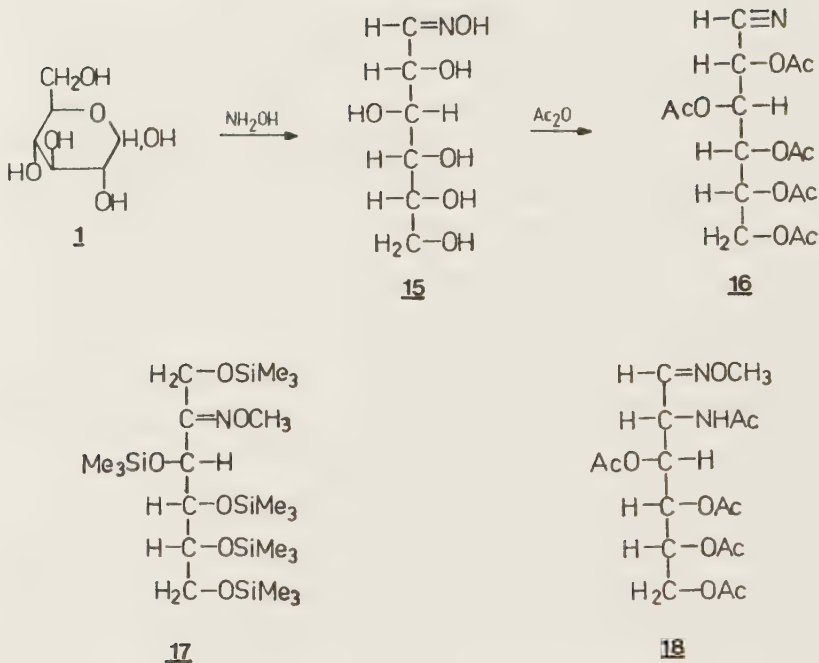
Reduzierende Zucker reagieren mit Hydroxylamin bzw. O-Alkyl-Hydroxylaminen zu offenkettigen Zuckeroximen (z.B. 15).

Diese lassen sich anschließend durch geeignete Derivatisierung der OH-Gruppen in flüchtige, gaschromatographisch gut bestimmbare Produkte überführen, wobei aus einem Zucker nur ein Derivat entsteht (wenn man von den syn/anti-Formen der Oxime absieht). Dieses Prinzip wird seit einigen Jahren in mehreren Varianten angewendet:

bei der Umsetzung von Aldosen mit Hydroxylamin und anschließender Acetylierung erhält man die Aldonitrilacetate^{16,17} (z.B. 16). Im Verlauf der Acetylierung wird das Aldoxim durch Acetanhydrid zum Nitril dehydratisiert.

Aldosen wie Ketosen lassen sich durch Reaktion mit O-Methylhydroxylamin und darauffolgende Silylierung leicht in die O-Trimethylsilyl-O-Methyloximderivate überführen^{18,19} (z.B. 17).

Die Trennung von Aminosukcern kann gaschromatographisch durch Bildung von O-Methyloximacetaten erreicht werden²⁰ (z.B. 18).



Diese Derivatisierungsverfahren schienen auch auf andere Hydroxyaldehyde- und Ketone anwendbar. Durch Stabilisierung von Carbonylfunktionen als Oxime sollten auch sehr reaktive Zuckerumwandlungsprodukte (z.B. Methylglyoxal) erfassbar sein.

4. Umsetzung von Zuckerspaltprodukten zu Oximacetaten

Die Bildung von Oximen kann sowohl im Sauren als auch im Alkalischen erfolgen. Die optimalen pH-Werte liegen bei 5 und 8²¹. Da Zucker und auch ihre Abbauprodukte vor allem im Alkalischen labil sind, müssen saure Bedingungen gewählt werden. Als Lösungsmittel wird bei den zitierten Zuckerderivatisierungen trockenes Pyridin verwendet. Ich entschied mich dagegen für ein Methanol/Wasser-Gemisch, um eventuelle Lösungsschwierigkeiten bei der Derivatisierung der polaren Bräunungsgemische zu vermeiden. Unter diesen Bedingungen setzte ich Dihydroxyaceton (6) als Modellsubstanz mit Hydroxylamin, O-Methylhydroxylamin und O-Benzylhydroxylamin um. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und mit Acetanhydrid/Natriumacetat acetyliert. Nach Abtrennung der überschüssigen Derivatisierungsreagenzien und Hochvakuumdestillation konnte ich 19, 20 und 21 gaschromatographisch rein erhalten.

Im allgemeinen entstehen bei der Oximbildung aufgrund der cis/trans-Isomerie an der C-N-Doppelbindung zwei Produkte. Da Dihydroxyaceton symmetrisch gebaut ist, liegt in diesem Fall jedoch jeweils nur ein Derivat vor.

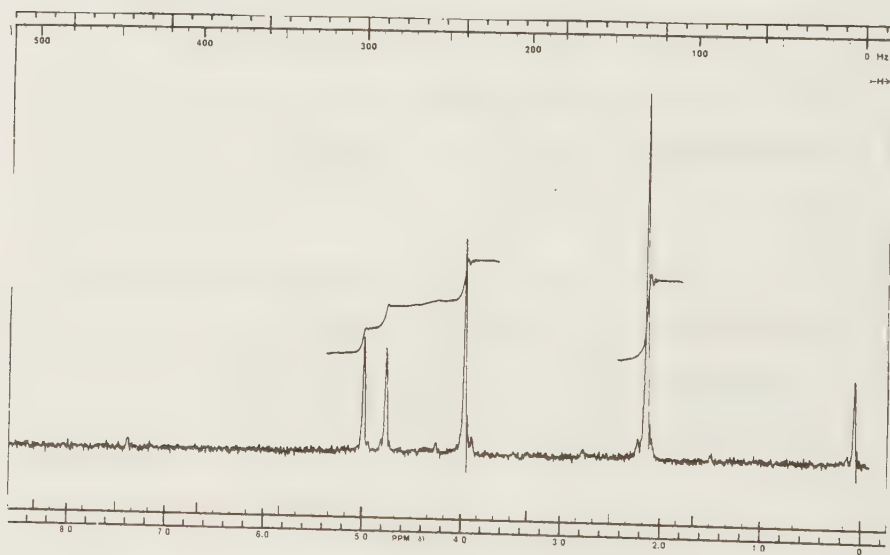
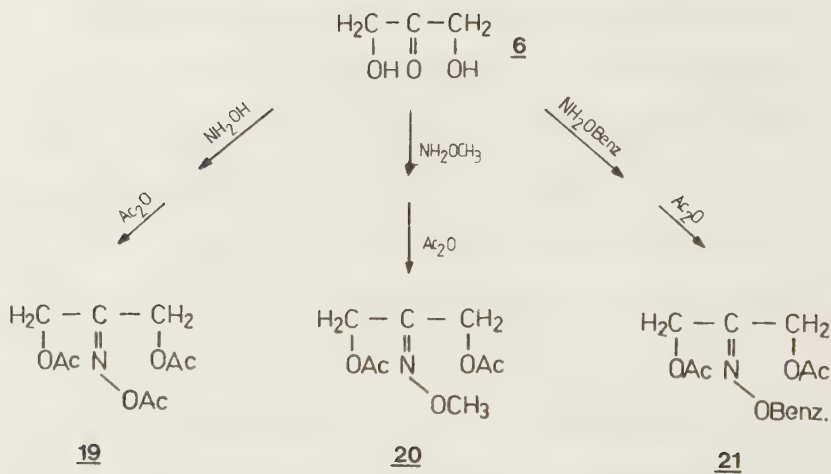
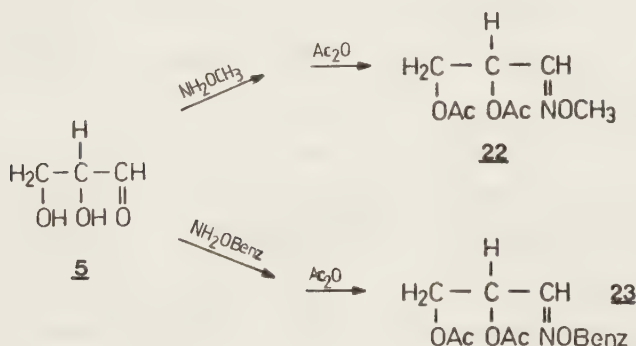


Abb. 1: NMR-Spektrum von 20 in CDCl_3

Abb. 1 zeigt das NMR-Spektrum von 20. Die um ca. 0,2 ppm unterschiedliche chemische Verschiebung der beiden Methylengruppen kommt dadurch zustande, daß eine von ihnen durch die räumlich benachbarte Methoxygruppe des Oxims beeinflusst wird.

Durch Umsetzung von Glycerinaldehyd (5) mit O-Methyl- bzw O-Benzylhydroxylamin und anschließende Acetylierung konnte ich die entsprechenden Derivate 22 und 23 erhalten.

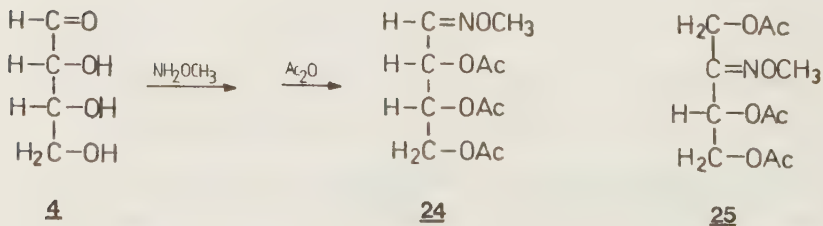


22 und 23 liegen jeweils als Gemisch von syn- und anti-Form vor. Der gaschromatographische Nachweis wird dadurch jedoch nicht beeinträchtigt, da die Isomerengemische charakteristische, gut bestimmbare Doppelpeaks ergeben.

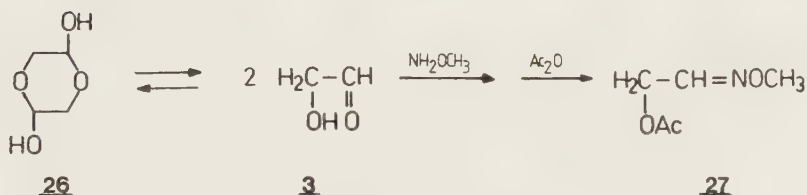
Bei meinen weiteren Untersuchungen beschränkte ich mich auf die Herstellung der O-Methyloximacetate, da durch die Einführung des großen Benzylrestes die Auftrennung der

niedermolekularen Spaltprodukte sehr erschwert wird. So lassen sich z.B. die O-Methyloximacetate von Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton gaschromatographisch vollständig voneinander trennen, während sich unter den gleichen Bedingungen die O-Benzoyloximacetate überlagern. Außerdem sind die O-Methyloximderivate wesentlich flüchtiger, so daß sie sich auch zur Bestimmung höhermolekularer Substanzen eignen.

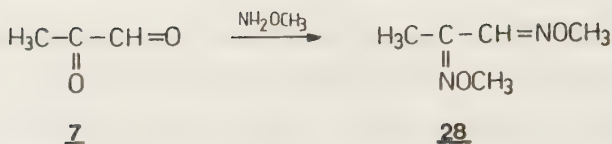
Die Derivatisierung von D-Erythrose (4) ergab neben dem gewünschten Produkt 24 noch ein weiteres, das im Gaschromatogramm als zweiter, wenn auch wesentlich kleinerer Doppelpeak erschien (siehe Abb. 2). Das Molekulargewicht entspricht dem des Hauptderivates. Es handelt sich deshalb vermutlich um die derivatisierte Erythrulose (25). Ob dieser Ketozucker während der Derivatisierung durch Isomerisierung gebildet wird, oder schon als Verunreinigung der Erythrose in den Ansatz miteingebracht wird, wurde nicht geklärt.



Glykolaldehyd (3) ist eine sehr reaktive, leichtflüchtige Flüssigkeit von Siedepunkt 96°C . Daneben existiert ein kristallines, cyclisches Dimeres (26), das in Lösung allmählich in die monomere Form übergeht. Aufgrund seiner großen Kondensationsneigung kann eine direkte Bestimmung des Glykolaldehyds nur unter sehr schonenden Bedingungen erfolgen. Für die Bestimmung in einem komplexen Reaktionsgemisch ist die Überführung in ein stabiles Derivat notwendig. Die Bildung des O-Methyloximacetates erwies sich dazu als gut geeignet. Im Gaschromatogramm erscheinen die syn/anti-Isomeren wieder als Doppelpeak.



Als α -Dicarbonylverbindung geht das Methylglyoxal (7) noch leichter Kondensationsreaktionen ein als der Glykolaldehyd. Eine Stabilisierung ist wiederum durch Umsetzung mit O-Methylhydroxylamin möglich. Man erhält das Bis-O-Methyloxim 28, das gut gaschromatographisch bestimmbar ist.



Die Umsetzung zu den O-Methyloximacetaten verläuft in allen Fällen weitgehend quantitativ und ohne Zersetzungsreaktionen. Man erhält für jedes Spaltprodukt im Gaschromatogramm im wesentlichen nur einen Peak bzw. Doppelpeak. Somit sollte mit Hilfe dieses Derivatisierungsverfahrens die Bestimmung der Produkte in komplexen Bräunungsgemischen möglich sein.

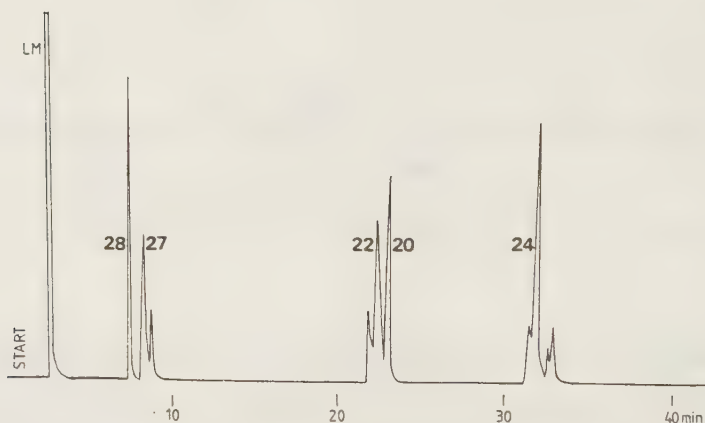
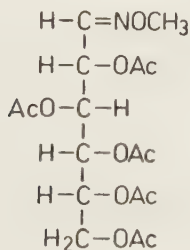


Abb. 2: Gaschromatographische Trennung der Derivate von Methylglyoxal (28), Glykolaldehyd (27), Glycerinaldehyd (22), Dihydroxyaceton (20) und Erythrose (24).

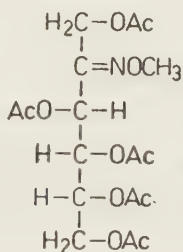
5. Bildung der O-Methyloximacetate von Zuckern und wichtigen Abbauprodukten

Bei der Anwendung des Derivatisierungsverfahrens auf Bräunungsansätze werden nicht nur die beschriebenen Spaltprodukte erfaßt, sondern auch die Zucker selbst, sowie ein Großteil der niedermolekularen, polaren wie unpolaren Umwandlungsprodukte. Zur Identifizierung ihrer Derivate im Gaschromatogramm war die Herstellung von Vergleichsubstanzen notwendig.

Die Umsetzung von Glucose bzw. Fructose zu den peracetylierten O-Methyloximen 29 bzw. 30 verlief ohne die Bildung gaschromatographisch nachweisbarer Nebenprodukte. Dies zeigt, daß unter den Derivatisierungsbedingungen keine Kunstprodukte entstehen, die eine Untersuchung von Bräunungsgemischen verfälschen könnten. 29 und 30 ergeben im Gaschromatogramm jeweils einen Peak (syn/anti-Formen werden nicht aufgetrennt). Beide Derivate lassen sich eindeutig anhand ihrer NMR- und MS-Spektren unterscheiden.

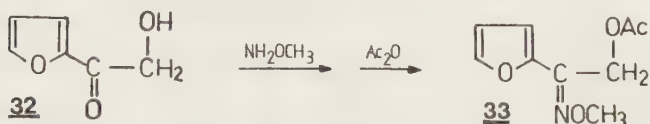


29

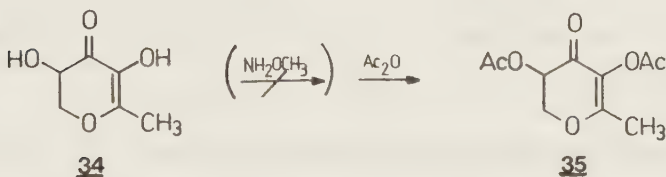


30

33. Daneben findet man bei der gaschromatographischen Untersuchung stets auch in geringen Mengen das acetylierte Hydroxyacetylfuran mit freier Ketogruppe.



2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (34) entsteht bevorzugt bei der Umsetzung von Hexosen mit primären oder sekundären Aminen, jedoch auch bei der Hitzebehandlung kohlenhydrat- und eiweißreicher Nahrungsmittel. 34 stellt somit eine Indikatorsubstanz für Maillard-Reaktionen dar. Die Anwendung der Derivatisierungsmethode auf 34 führt zum Bisacetylderivat 35. Die Ketogruppe reagiert mit O-Methylhydroxylamin vermutlich deshalb nicht, weil sie als vinyloger Ester stabilisiert ist.



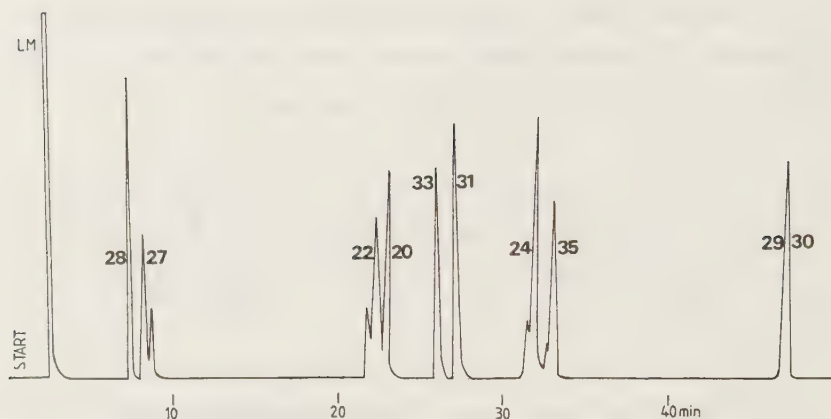


Abb. 3: Gaschromatographische Trennung der Derivate von Methylglyoxal (28), Glykolaldehyd (27), Glycerinaldehyd (22), Dihydroxyaceton (20), Hydroxyacetyl-furan (33), Hydroxymethylfurfurol (31), Erythrose (24), Dihidropyranon 34 (35), Glucose (29) und Fructose (30).

6. Nachweis der Zuckerspaltprodukte in Bräunungsansätzen

Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens untersuchte ich, unter welchen Bedingungen Glucose und Fructose zu niedermolekularen Spaltprodukten abgebaut werden.

a. Trockenes Erhitzen von Glucose und Fructose

Ich erhitzte Glucose und Fructose im Becherglas unter Rühren in ca. 10 min auf 160°C und ließ diese Temperatur noch

weitere 10 min einwirken. Anschließend löste ich die dunkelbraune, zähflüssige Masse in heißem Wasser und derivatisierte in beschriebener Weise. Um sicherzustellen, daß sämtliche reaktiven Aldehyd- und Ketogruppen des Karamelisierungsgemisches in O-Methyloxime übergeführt werden, ist der Zusatz einer großen Menge O-Methylhydroxylamin nötig. Der überschüssige Teil davon reagiert bei der anschließenden Acetylierung mit Acetanhydrid zu einigen nicht näher untersuchten leichtflüchtigen Verbindungen, die im GC-Spektrum Retentionszeiten von 5-8 min aufweisen. Damit beeinträchtigen sie den Nachweis von Methylglyoxal und Glykolaldehyd, deren Derivate ebenfalls in diesem Bereich erscheinen, jedoch in wesentlich geringerer Menge vorliegen. Ich beschränkte mich deshalb zunächst auf den Nachweis der etwas schwerer flüchtigen Zuckerspaltprodukte. Die Nebenprodukte der Derivatisierung lassen sich leicht durch HV-Destillation entfernen. Schon bei Raumtemperatur gehen sie in die CO₂-gekühlte Kühlfalle über. Anschließend wird am Hochvakuum bis 120°C destilliert, um eine Verschmutzung der GC-Säule durch höhermolekulare Substanzen zu vermeiden. Die GC-Spektren der farblosen, zähflüssigen Destillate sind in den Abb. 4 und 5 dargestellt. Aus ihnen geht deutlich hervor, daß Fructose eine größere Reaktivität besitzt als Glucose: unter gleichen Umsetzungsbedingungen ist wesentlich mehr Fructose abgebaut als Glucose. Von den Abbauprodukten konnte

jeweils nur das Hydroxymethylfurfurol (31) eindeutig identifiziert werden. C,C-Spaltprodukte waren in beiden Fällen nicht nachweisbar. Offenbar finden unter den neutralen bis schwach sauren Karamelisierungsbedingungen (im Verlauf der Reaktion werden Säuren gebildet) kaum Retroaldolreaktionen statt.

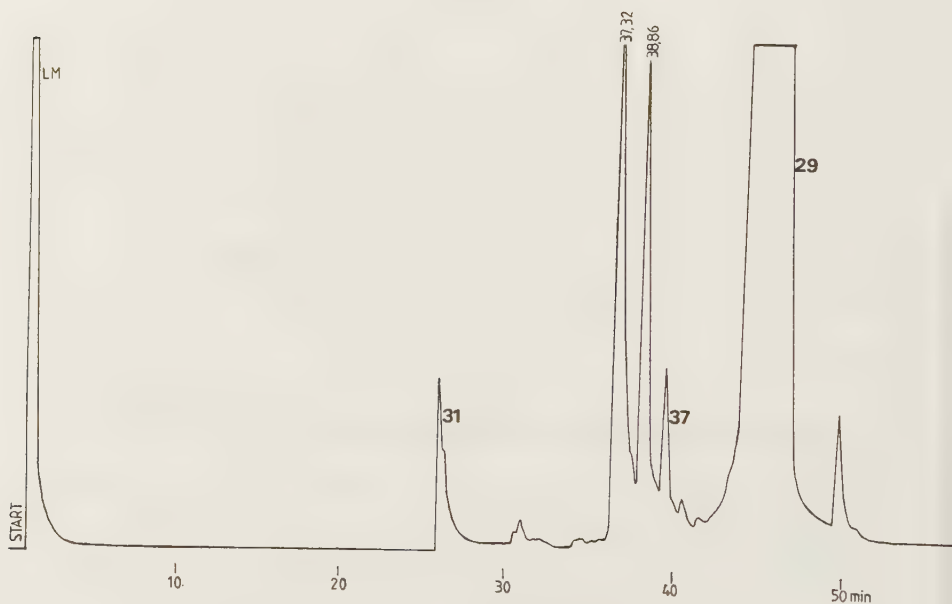


Abb. 4: Glucose-Karamel, derivatisiert

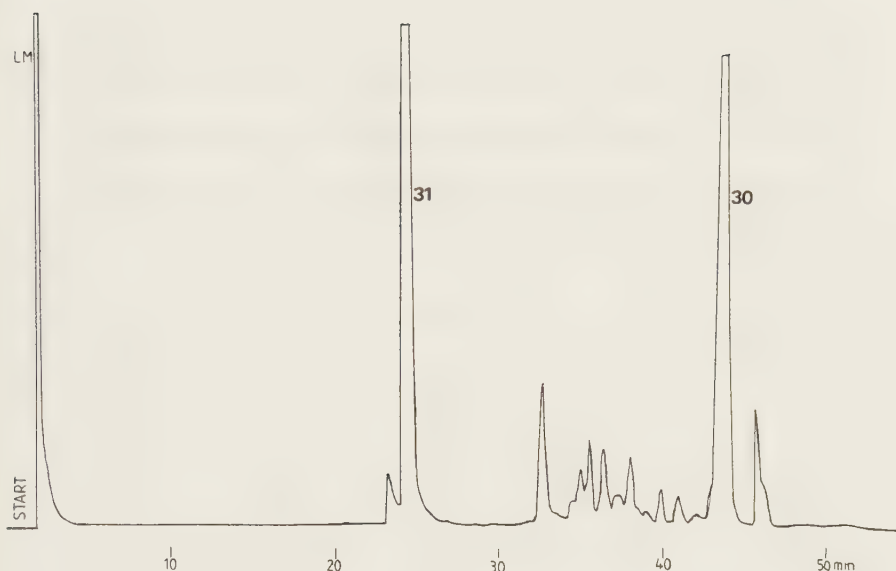


Abb. 5: Fructose-Karamel, derivatisiert

b. Trockenes Erhitzen von Fructose unter Zusatz von
Natriumcarbonat

Der Zuckerabbau lässt sich durch Zugabe von Basen wesentlich beschleunigen. Für die Herstellung von Zuckercouleur, das z.B. zum Färben von Bier oder Rum dient, werden Zucker (vor allem Stärkezucker) meist im Alkalischen erhitzt. Zulässig ist der Zusatz von Ammonium-, Natrium- und Kaliumsalzen der Essig-, Phosphor- und Kohlensäure, sowie von Ammonium-, Natrium- und Kaliumhydroxid. Inwieweit unter diesen Bedin-

gungen mit der Bildung von Spaltprodukten zu rechnen ist, sollte die Umsetzung von Fructose mit 10% Na_2CO_3 zeigen. Da sich das Reaktionsgemisch wesentlich schneller braun färbte als ohne Basenzusatz, erhitzte ich insgesamt nur 10 min. Nach Derivatisierung und Aufarbeitung erhielt ich das in Abb. 6 dargestellte GC-Spektrum.

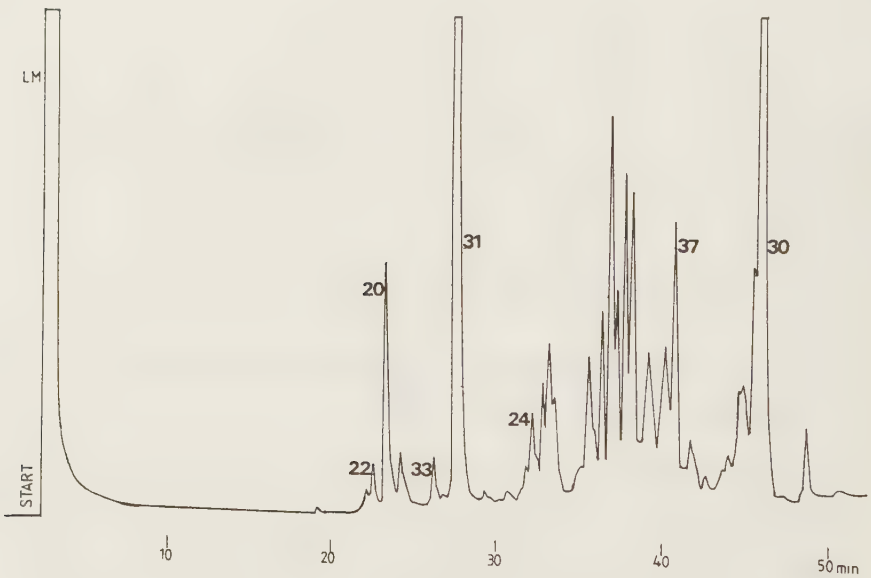


Abb. 6: Fructose unter Na_2CO_3 -Zusatz karamelisiert, derivatisiert

Neben Fructose (30), Hydroxymethylfurfurol (31) und Hydroxyacetylfuran (33) konnten die Derivate von Glycerinaldehyd (22), Dihydroxyaceton (20), Erythrose (24) und Methylglyoxal (28) durch GC/MS-Analyse eindeutig nachgewiesen werden. Zur Prüfung auf Methylglyoxal wurde ein Teil der Probe nach der Oximbildung mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und der Extrakt getrennt untersucht.

Ein beinahe identisches GC-Spektrum erhielt ich nach entsprechender Umsetzung von Fructose mit 0,5% Ammoniumcarbonat.

Die relativ große Menge an Spaltprodukten zeigt, daß die zu ihrer Bildung notwendigen Retroaldolreaktionen durch alkalische Bedingungen stark begünstigt werden.

c. Umsetzung von Glucose und Fructose unter Bedingungen der Maillard-Reaktion

Die Karamelisierung von Kohlenhydraten erfolgt oberhalb von etwa 120°C. Unter der katalytischen Wirkung von Aminosäuren oder Aminen tritt Zuckerabbau bereits bei niedrigen Temperaturen (50-70°C) ein. Für die Bräunungsreaktion beim Erhitzen von Lebensmitteln wird vor allem die freie ϵ -Aminogruppe des Lysins verantwortlich gemacht. In Modellansätzen verwendet man zur Vereinfachung des Reaktionsgeschehens anstelle des Lysins oft einfachere Alkylamine wie z.B. Methylamin.

Ich erhitzte Fructose mit 10% Methylammoniumacetat auf der Heizplatte 10 min auf 120°C. Nach Derivatisierung und Aufarbeitung erhielt ich das in Abb. 7 dargestellte Gaschromatogramm. Darin sind deutlich die Derivate von Glycerinaldehyd (22) und Dihydroxyaceton (20) zu erkennen. Erythrose (24) ist in geringerer Menge vorhanden, Methylglyoxal und Glykolaldehyd konnten nicht nachgewiesen werden.

Setzt man Fructose mit 10% Methylammonacetat in wäßriger Lösung 3 Std bei 75°C um, dann ist die Ausbeute an 22, 20 und 24 etwas niedriger. Ein eindeutiger Nachweis ist nach fraktionierter HV-Destillation der Derivate gut möglich.

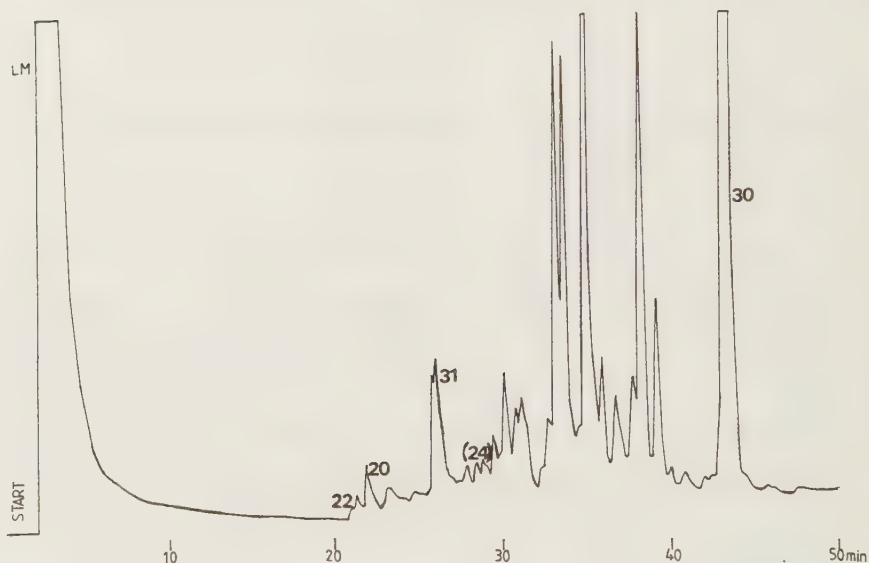


Abb. 7: Fructose + Methylammonacetat trocken erhitzt, derivatisiert

Noch etwas geringere Mengen erhält man bei der Verwendung von Glucose anstelle von Fructose.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bildung von Zucker-C,C-Spaltprodukten vor allem im Alkalischen erfolgt, in geringerem Umfang auch bei Maillard-Reaktionen im neutralen Bereich, dagegen praktisch nicht beim Karamelisieren unter neutralen oder schwach sauren Bedingungen.

d. Untersuchung von Brezenkruste

Bei der Herstellung von Brezen wird der geformte Teig vor dem Backprozeß mit Lauge bestrichen, um eine Dunkelfärbung der Kruste und das typische Aroma zu erzielen. Somit sind an der Oberfläche Reaktionsbedingungen gegeben, die den Ablauf von Retroaldolreaktionen vermuten lassen. Ich untersuchte deshalb den Heißwasserextrakt von zerkleinerter Brezenkruste mit dem beschriebenen Verfahren. Über GC/MS-Analyse konnten Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton eindeutig nachgewiesen werden (Gaschromatogramm siehe experimenteller Teil).

7. Nachweis weiterer Zuckerumwandlungsprodukte

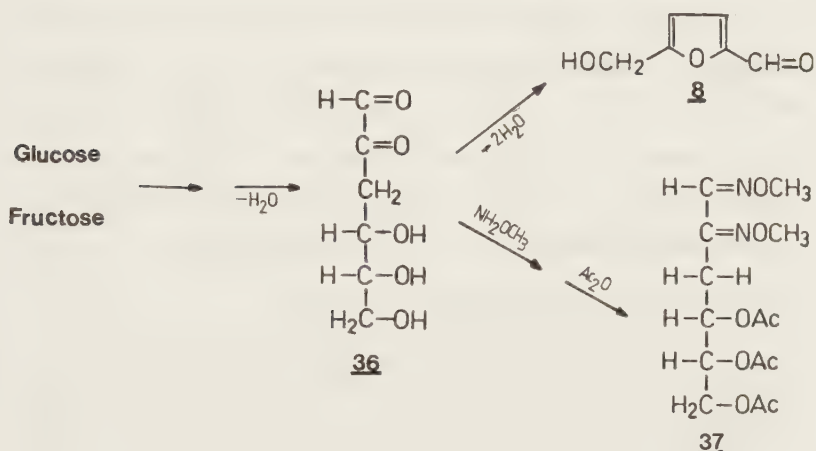
Die Gaschromatogramme der Bräunungsansätze weisen neben den beschriebenen Derivaten noch eine Vielzahl weiterer derivatisierter Zuckerumwandlungsprodukte auf. Erfasst wird ein Großteil der niedermolekularen Abbauprodukte, unpolare wie polare, mit Ausnahme von Säuren. Somit sollte ein einfacher Nachweis von polaren, reaktiven und nur schwer isolierbaren Zwischen- und Endprodukten des Zuckerabbaus möglich sein.

a. Nachweis durch Herstellung von Vergleichsderivaten

Leicht kann die Identifizierung von Substanzen erfolgen, wenn - wie bei den Spaltprodukten - die entsprechenden Vergleichsderivate zur Verfügung stehen. Durch Zuspritzen und Vergleich der MS-Spektren (über GC/MS) ist dann ein eindeutiger Nachweis möglich.

In den von mir untersuchten Bräunungsansätzen war stets eine große Menge an Hydroxymethylfurfurol (8) nachweisbar. Es war deshalb zu erwarten, daß auch eine der Vorstufen, die 3-Deoxyhexosulose (36), als O-Methyloximacetat 37 im Derivatisierungsgemisch vorlag. 36, ein wichtiges Zwischenprodukt des Zuckerabbaus, wurde erstmals von E. Anet²² als Osazon isoliert. Für die Herstellung von 36 aus Glucose gibt es verschiedene Verfahren, die alle relativ aufwendig sind. Nach einer Vorschrift von El Khadem und Mitarbeitern²³

erhielt ich 36 nur in geringen Mengen. Die Derivatisierung ergab ein flüchtiges Produkt mit der Masse 346. Diese ließ auf das Vorliegen von Verbindung 37 schließen. Mit Hilfe des Vergleichsderivates gelang der Nachweis von 36 in verschiedenen Bräunungsansätzen (siehe Abb. 4, 6).



b. Nachweis durch GC-Splitting

Über die Herstellung von Vergleichsubstanzen ist der Nachweis bereits bekannter Zuckerumwandlungsprodukte möglich. Die Strukturermittlung neuer Verbindungen könnte durch Abtrennung und Anreicherung ihrer Derivate mittels GC-Splitting erfolgen. Dieses angesichts der Vielzahl von Komponenten äußerst langwierige Verfahren läßt sich durch geeignete Vortrennungen verkürzen. So kann z.B. der unzersetzte Zucker,

dessen Derivat oft den Hauptpeak im Gaschromatogramm darstellt, von den übrigen Produkten abgetrennt werden. Dazu zieht man das Karamelisierungsgemisch auf Cellulose auf und extrahiert mit Essigester. Der Zucker bleibt an der Cellulose haften, während die etwas unpolarereren Abbauprodukte eluiert werden.

Auf diese Weise konnten die beiden Hauptprodukte des Glukosekaramels (Abb. 4; Retentionszeiten: 37.32 und 38.86 min) angereichert und anschließend durch GC-Splitting voneinander getrennt werden. Jedoch gelang es mir nicht, ihre Strukturen aufzuklären, da die angefertigten Spektren (siehe experimenteller Teil) wenig aufschlußreich waren.

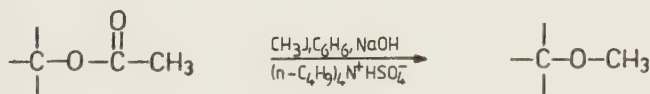
c. Strukturhinweise durch GC/MS-Analyse

Durch GC/MS-Analyse der derivatisierten Bräunungsgemische sollten Hinweise auf die Struktur der einzelnen Komponenten erhalten werden. Dabei traten jedoch folgende Schwierigkeiten auf:

- in den wenigen Fällen, in denen die Molekülmasse eindeutig bestimmt werden konnte (z.B. 300), gelang es mir nicht, sie mit plausiblen Strukturvorschlägen zu vereinbaren
- meist war der Molekülpeak nicht eindeutig zu ermitteln; vor allem die aliphatischen, mehrfach acetylierten Moleküle werden praktisch vollständig in Bruchstücke gespalten. Da bevorzugt eine Abspaltung der Acetylreste erfolgt, lassen die Spaltungsmuster kaum Rückschlüsse auf Strukturelemente zu.

Im Hinblick auf die Auswertung der MS-Spektren schienen O-Methylderivate besser geeignet als die O-Acetylverbindungen. Ich untersuchte deshalb, unter welchen Reaktionsbedingungen eine annähernd vollständige und schonende Methylierung verschiedener O-Alkyloximalkohole möglich ist. Am günstigsten erwies sich dabei die Kombination von Methyljodid mit Natriumhydrid als Base und Dimethylformamid als Lösungsmittel. Auf diese Weise konnten die O-Methyloxime von Fructose und Hydroxymethylfurfurol, sowie Dihydroxyaceton-O-Benzylloxim in sehr guten Ausbeuten permethyliert werden.

Vor kurzem wurde eine schonende Methode zur Herstellung von permethylierten Zuckern veröffentlicht²⁴. Dabei wird der Zucker zunächst peracetyliert und dann im Zwei-Phasen-System (Benzol, NaOH, Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als Phasenvermittler) durch Einleiten von Methylbromid unter Druck in das Permethylderivat überführt. Ich vereinfachte die Versuchsbedingungen, indem ich anstelle des gasförmigen Methylbromids Methyljodid verwendete. Nach wenigen Stunden Rühren bei Raumtemperatur war die Testsubstanz Bisacetoxyaceton-O-Benzylloxim ohne gaschromatographisch nachweisbare Nebenprodukte zum entsprechenden Bis-O-Methylderivat umgesetzt.



Neben der direkten Methylierung steht somit noch eine weitere Methode zur Bildung von permethylierten O-Methyloximen zur Verfügung. Ob über diese Derivate eine Struktur-
aufklärung von Zuckerumwandlungsprodukten möglich ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

B) Nachweis von Reduktonen

1. Einführung

Im Verlauf des Zuckerabbaus werden auch Substanzen mit stark reduzierenden Eigenschaften gebildet: Reduktone und Amino-reduktone. Man nimmt an, daß diese Verbindungen aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung bei verschiedenen Lebensmitteln (z.B. Bier, Schokolade) zur Geschmacksstabilisierung beitragen. Bisher diente hauptsächlich die Messung von Redoxpotentialen als Beweis für das Vorkommen von Reduktonen in Lebensmitteln. Definierte Substanzen konnten nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden (z.B. die cyclischen Reduk-tonether 34, 41 und 42). Aus Modellansätzen gelang jedoch die Isolierung einer Reihe von Substanzen mit der für Reduk-tone charakteristischen Carbonyl-Endiol-Struktur. Derarti-ge Verbindungen lassen sich im Sauren durch Jod zu den ent-sprechenden 1,2,3-Tricarbonylprodukten oxidieren:



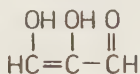
Das einfachste Redukton ist das sog. Triose-Redukton (38).

Es entsteht in relativ großer Menge bei der Einwirkung von Natronlauge auf reduzierende Zucker²⁵. Die Base begünstigt die Retroaldolreaktion, die zur C,C-Spaltung führt.

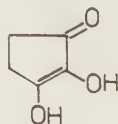
Xylose, Pektin und Galakturonsäure bilden beim Erhitzen in saurer, wäßriger Lösung die cyclische Reduktinsäure (39)²⁶.

Auch das schon lange als Zuckerumwandlungsprodukt bekannte Diacetylformoin (40) ist als Redukton anzusehen, wie die offenkettige Schreibweise 40a verdeutlicht. Bevorzugt dürfte jedoch die Halbacetalform 40b vorliegen und damit das Strukturelement eines cyclischen Reduktonethers. Das Redoxverhalten wird dadurch nicht wesentlich beeinflusst: auch cyclische Reduktonether wie z.B. 34 lassen sich mit Jod oder Eisen(III)-chlorid oxidieren²⁷.

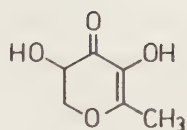
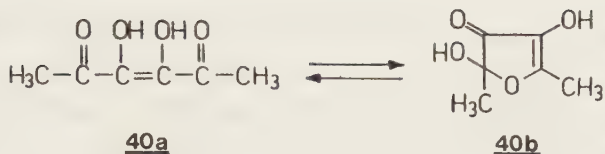
Das Dihydropyranon 34 entsteht aus Hexosen und ist ein typisches Produkt für Maillard-Reaktionen. Unter diesen Bedingungen erhält man aus Pentosen bzw. Methylpentosen die Dihydrofuranone 41 bzw. 42, ebenfalls cyclische Reduktonether^{28,29}. 34, 41 und 42 wurden bereits in verschiedenen erhitzten Nahrungsmitteln nachgewiesen^{30,31}.



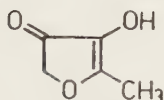
38



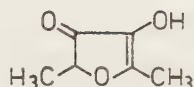
39



34



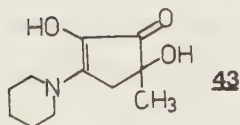
41



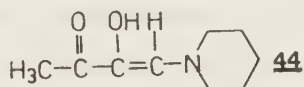
42

Bei der Umsetzung von Hexosen mit primären oder sekundären Aminen entstehen auch Reduktone, die anstelle einer OH-Gruppe einen Aminrest aufweisen und deshalb als Aminoreduktone bezeichnet werden. Hodge und Mitarbeiter haben eingehend Reaktionsgemische von Zuckern mit sekundären Aminen untersucht. Sie fanden, daß beim Erhitzen von Glucose mit Piperidiniumacetat in Ethanol das sog. Aminohexoseredukton (43) in bemerkenswert großer Menge gebildet wird³².

Daneben läßt sich auch das C4-Redukton 44 isolieren.



43

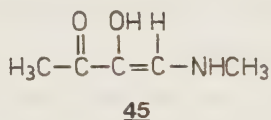


44

In Lebensmitteln spielen jedoch Umsetzungen von Zuckern mit sekundären Aminen eine weit geringere Rolle, da die Aminosäuren mit Ausnahme des Prolins und Hydroxyprolins den primären Aminen zuzuordnen sind und im Eiweiß bevorzugt die Aminogruppe der Lysinseitenkette Reaktionen eingeht.

Aus Bräunungsansätzen von Zuckern mit primären Aminen konnten Aminohexosereduktone des Typs 43 trotz empfindlicher Nachweismethoden^{33,34} bisher nicht erhalten werden. Die Frage, ob derartige Reduktone unter diesen Bedingungen nicht gebildet werden oder zu unbekannten Produkten weiterreagieren, ist noch zu klären.

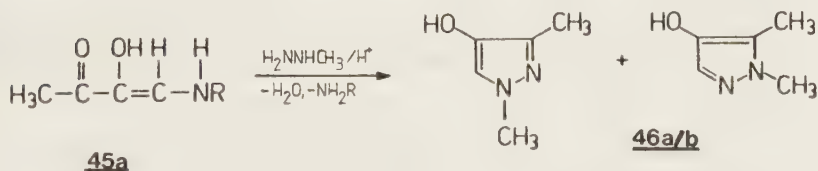
Vor wenigen Jahren gelang es Ledl und Severin³⁵, aus einem Glucose/Methylamin-Bräunungsgemisch das 44 analoge C4-Aminoreduktion 45 zu isolieren.



Andere primäre Amine (z.B. Glycin) lieferten entsprechende Verbindungen. Es war deshalb zu vermuten, daß C4-Aminoreduktone auch beim Erhitzen von Lebensmitteln gebildet werden.

2. Nachweisverfahren mit Methylhydrazin

In Lebensmitteln entstehende Aminoreduktone können an verschiedene Aminkomponenten gebunden sein, wie Aminosäuren, Peptide und Proteine. Für ihren Nachweis ist deshalb ein Verfahren nötig, bei dem die Aminkomponenten abgespalten und die Reduktone in stabile, leicht nachweisbare Derivate überführt werden. Beides läßt sich durch Umsetzung mit Methylhydrazin erreichen. In zahlreichen Versuchen erwies sich dieses Reagens als sehr gut geeignet für den Nachweis von C4-Aminoreduktionen³⁴. Man erhält ein Gemisch der beiden isomeren Hydroxypyrazole 46a und 46b.



Da diese amphoter sind, lassen sie sich leicht durch Ausschütteln von störenden Begleitsubstanten abtrennen. Eine quantitative Bestimmung ist gaschromatographisch möglich, wobei 46a und 46b zwei nahe beieinander liegende Peaks ergeben.

3. Nachweis von C4-Aminoreduktionen

Nach dieser Bestimmungsmethode wurden zahlreiche Zucker/Aminosäure-Bräunungsansätze auf die Bildung von C4-Aminoreduktionen hin untersucht. G. Fritsch hat gezeigt, daß reduzierende Monosaccharide erheblich größere Mengen ergeben als Disaccharide. Nach vierstündigem Erhitzen einer wäßrigen Lösung äquimölarer Anteile Fructose und Glycin auf 100°C konnte sie im Reaktionsgemisch ca. 30 ppm C4-Aminoreduktion nachweisen (bezogen auf die eingesetzte Zuckermenge).

Ich verwendete anstelle von Glycin Lysin-Hydrochlorid als Aminkomponente und erhielt bei sonst gleichen Bedingungen etwas höhere Werte. Der pH-Wert lag bei diesen Umsetzungen im schwach sauren Bereich (ca. 5,5-6). Startete ich die Reaktion durch Zugabe von Natronlauge im schwach Alkalischen, so war die nachgewiesene Menge an C4-Reduktion um das 50-100-fache größer. Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, daß Retroaldolspaltungen durch Basen stark begünstigt werden.

Die Herstellung einer Reihe von Nahrungsmitteln (z.B. Bier, Kaffee, Kakao) verläuft über Röstprozesse, bei denen Temperaturen von teilweise weit über 100°C erreicht werden. Um herauszufinden, inwieweit bei solch drastischen Bedingungen mit der Bildung bzw. dem Intaktbleiben der C4-Aminoreduktone zu rechnen ist, erhitze ich Fructose und Glycin

ohne Wasserzusatz 15 min auf 120 und 150°C. In beiden Fällen erhielt ich C4-Aminoreduktongehalte von ca. 110 ppm. Trotz erheblich kürzerer Reaktionszeit lagen diese Werte beträchtlich über denen der Umsetzungen in wäßriger Lösung. Aufgrund der positiven Ergebnisse aus den Modellreaktionen lag es nahe, das Nachweisverfahren auch auf Lebensmittel anzuwenden.

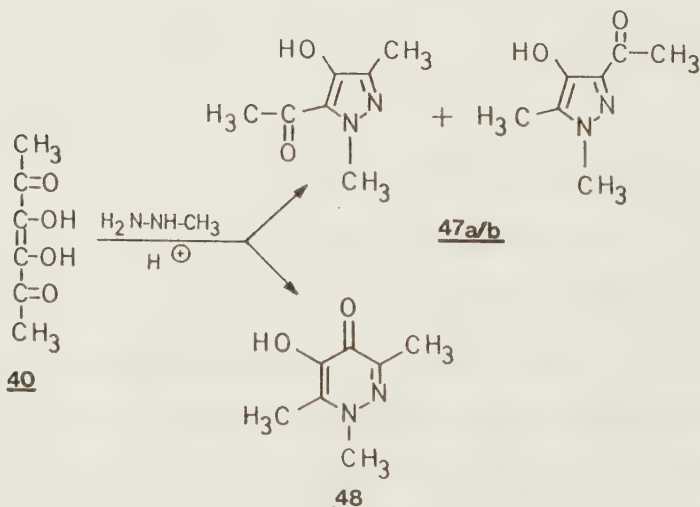
Die Haltbarkeit und Geschmacksstabilität von Bier wird durch den Gehalt an reduzierenden Substanzen erklärt, die u.a. beim Darren des Malzes entstehen. Jedoch ist nicht bekannt, um welche Reduktone es sich dabei handelt. Die Untersuchung von frisch gedarrtem, dunklen Brauereimalz ergab, daß C4-Aminoreduktone vorliegen, wenn auch in äußerst geringer Menge. Bezogen auf die eingesetzte Malzmenge bewegt sie sich im ppB-Bereich.

4. Nachweis von Diacetylformoin

Das Diacetylformoin (40) spielt als reaktives Zwischenprodukt beim thermischen Zuckerabbau vermutlich eine wichtige Rolle. U.a. wird es als Vorstufe des Aminohexosereduktions angesehen. Aufgrund seiner Flüchtigkeit konnte es bereits aus mehreren Zucker/Amin-Bräunungsgemischen isoliert werden^{36,37}. Die Mengen waren allerdings gering, was wohl auf die Instabilität dieser Verbindung zurückzuführen ist.

Im Verlaufe der Isolierung kann das Diacetylformoin leicht Folgereaktionen eingehen, so daß die quantitative Bestimmung verfälscht wird. Dies ließe sich vermeiden, wenn man bereits im wäßrigen Bräunungsgemisch ein stabiles Derivat herstellen könnte. Da das Diacetylformoin Reduktonstruktur besitzt, sollte das Methylhydrazinverfahren anwendbar sein.

Ich setzte deshalb synthetisiertes Diacetylformoin in saurer wäßriger Lösung mit Methylhydrazin um. Nach Neutralisation extrahierte ich mit Methylenchlorid und trennte die organische Phase dünnschichtchromatographisch auf. Dabei erhielt ich zwei Zonen mit stark unterschiedlichen Rf-Werten, die beide kristalline Produkte lieferten.



Die gaschromatographische Untersuchung der Kristalle aus der oberen Zone ergab zwei dicht nebeneinander liegende Peaks. Die Vermutung, es handelt sich dabei um die beiden stellungsisomeren Hydroxypyrazole 47a/b, wird durch die Spektren bestätigt. Im NMR-Spektrum erscheinen drei Methylgruppenpaare, da die chemische Verschiebung bei den Isomeren etwas unterschiedlich ist.

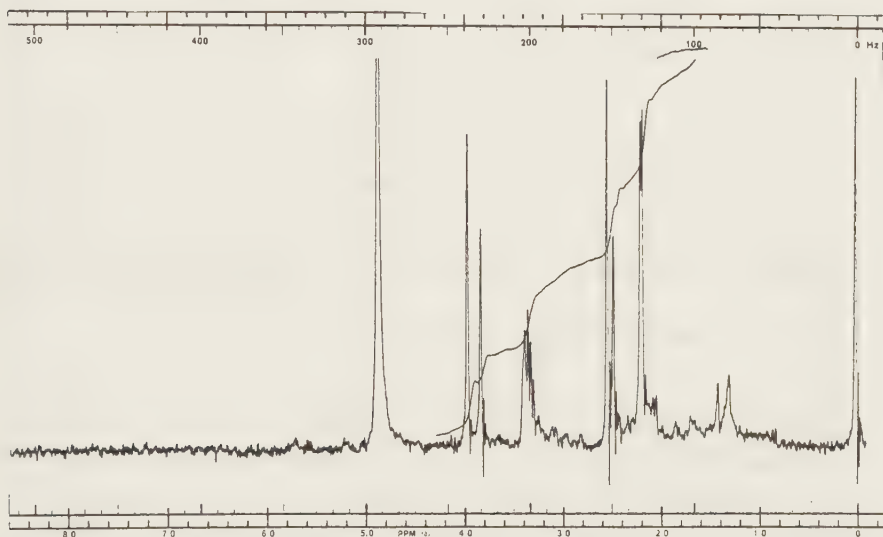


Abb. 8: NMR-Spektrum von 47a/b in CD_3OD

Die offenkettige Form des Diacetylformoins läßt deutlich erkennen, daß die Reaktion mit Methylhydrazin nicht nur zu den Pyrazolderivaten, sondern auch zum Hydroxypyridazinon 48 führen kann. Dieses erhielt ich als Hauptprodukt der Derivati-

sierung aus der unteren Zone.

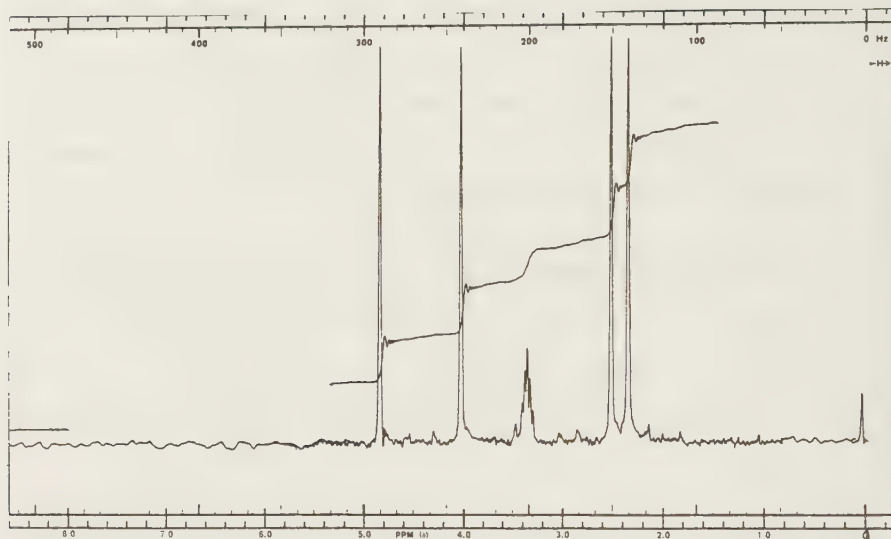


Abb. 9: NMR-Spektrum von 48 in CD_3OD

48, das weniger flüchtig ist als 47a/b, ließ sich gaschromatographisch nicht bestimmen. Es handelt sich jedoch um ein stabiles, gut kristallisierendes Derivat, das leicht dünnschichtchromatographisch identifiziert werden kann. Mit Hilfe der Umsetzung zu 47a/b und 48 konnte Diacetylformoin in Zucker/Aminosäureansätzen (siehe S. 40) nachgewiesen werden. Die Mengen lagen dabei weit über denen der C4-Aminoreduktone. Es zeigte sich, daß die Bildung von Diace-

tylformoin aus Zuckern im schwach Alkalischen noch zunimmt. Solche Bedingungen herrschen bei Lebensmitteln z.B. auf der Oberfläche von Brezen vor.

Durch Umsetzung mit Methylhydrazin gelang tatsächlich der Nachweis von Diacetylformoin in der Brezenkruste.

Auch in dunklem Malz konnte durch Anwendung dieser Methode Diacetylformoin nachgewiesen werden.

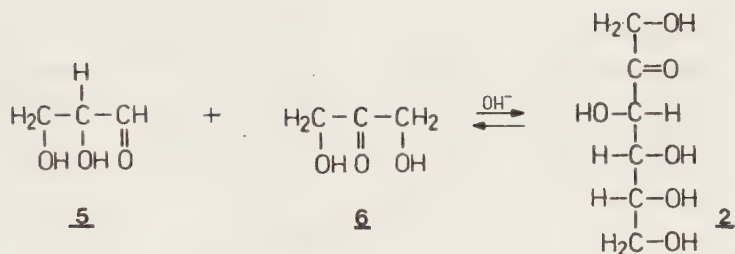
C) Strukturaufklärung farbiger Substanzen

1. Einführung

Über die Strukturen der hochmolekularen, braunen Melanoidine ist bis heute nahezu nichts Gesichertes bekannt, da schon die Abtrennung einigermaßen einheitlicher Pigmentfraktionen große Schwierigkeiten bereitet. Jedoch gelang in den letzten Jahren die Isolierung und Strukturaufklärung einiger gelber Verbindungen aus Modellansätzen. So kennt man jetzt zumindest einige Komponenten des Bräunungsprozesses und kann wichtige, verallgemeinerungsfähige Reaktionswege aufzeigen.

Als Grundlage der Melanoidinbildung wird im wesentlichen die Kondensation methylenaktiver Verbindungen oder elektrophil leicht angreifbarer Heterocyclen mit Aldehyden oder Ketonen angesehen. Doch welche Substanzen kommen als carbonylaktive und welche als CH-acide Reaktionspartner in Frage?

Zucker (Aldosen wie Ketosen; beide sind durch Enolisierung leicht ineinander überführbar) weisen sowohl Carbonyl- als auch Methylenaktivität auf, wie die schon lange bekannte Aldoladdition der Zuckermodellsubstanzen Glycerinaldehyd (5) und Dihydroxyaceton (6) zu Fructose (1) verdeutlicht:

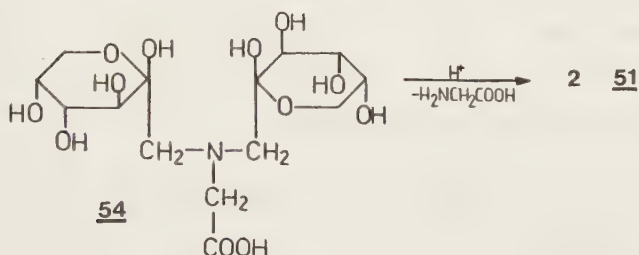


Unter geeigneten Bedingungen lassen sich auch Kondensationsreaktionen durchführen. Bei der Melanoidinbildung dürften jedoch weniger die Zucker selbst, als vielmehr ihre Abbau-
produkte die entscheidende Rolle spielen, da diese zum Teil erheblich reaktiver sind. Es ist daher wichtig, die grundlegenden Zuckerabbauwege mit ihren charakteristischen Zwischen- und Endprodukten zu kennen. Schema 2 zeigt diese für die gut untersuchte Reaktion einer Aldose (Hexose: R' = CH₂OH; Pentose: R' = H) mit einer Aminkomponente (primäres, sekundäres Amin oder Aminosäure)³⁸.

Das zunächst gebildete Aldosylamin 49 tautomerisiert in einer Amadori-Umlagerung zur 1-Amino-1-Deoxyketose (50), dem sog. Amadoriprodukt. Diese isolierbare Schlüsselsubstanz der Maillard-Reaktion kann bei erhöhter Temperatur in zwei Typen von α-Dicarbonylverbindung zerfallen. Beide werden stets nebeneinander gebildet, allerdings je nach Reaktionsbedingungen in wechselndem Mengenverhältnis. Bei neutralem bis schwach sauren pH-Wert und Einsatz einer Aminosäure



oder eines primärenamins im Unterschuß entsteht bevorzugt die 3-Deoxy-1,2-Dicarbonylverbindung 51. Unter diesen Bedingungen liegt überwiegend das Amadoriprodukt 54 vor, bei dem die primäre Aminogruppe mit zwei Aldosemolekülen reagiert hat:



Diese Di-Ketosylaminosäure zerfällt in schwach saurer Lösung rasch unter Freisetzung der Aminosäure in zwei Moleküle 3-Deoxy-1,2-Dicarbonylverbindung, die Vorstufe der relativ stabilen Endprodukte 8 bzw. 53.

Führt man dagegen die Bräunungsreaktion bei neutralem bis schwach basischem pH-Wert durch, so bilden sich überwiegend Produkte des Typs 34 bzw. 41. Ihre Entstehung ist nur über die 1-Deoxy-2,3-Dicarbonylverbindung 52 erklärbar, die jedoch noch nicht isoliert werden konnte.

Die α -Dicarbonylverbindungen sind signifikante Zwischenstufen des Zuckerabbaus von außerordentlicher Reaktivität.

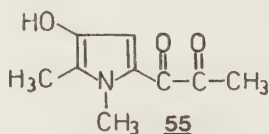
Nach Enolisierung sind leicht Dehydratisierungen möglich,

die zu den wichtigsten niedermolekularen Zuckerumwandlungsprodukten führen. Außerdem bewirken die α -Dicarbonylverbindungen den bekannten Strecker-Abbau der Aminosäuren.

Schließlich scheinen sie wegen ihrer gleichermaßen hohen Carbonylaktivität und CH-Acidität geradezu prädestiniert für Kondensationsreaktionen und damit für die Bildung farbigere Substanzen.

2. Farbige Verbindungen aus Hexosen

Bisher konnten aus Hexose-Bräunungsansätzen vier gelbe Verbindungen isoliert werden, die sich in ihrer Struktur sehr ähneln. Als Beispiel sei 55 aufgeführt, das bei der Reaktion von Glucose mit Methylamin entsteht³⁹:

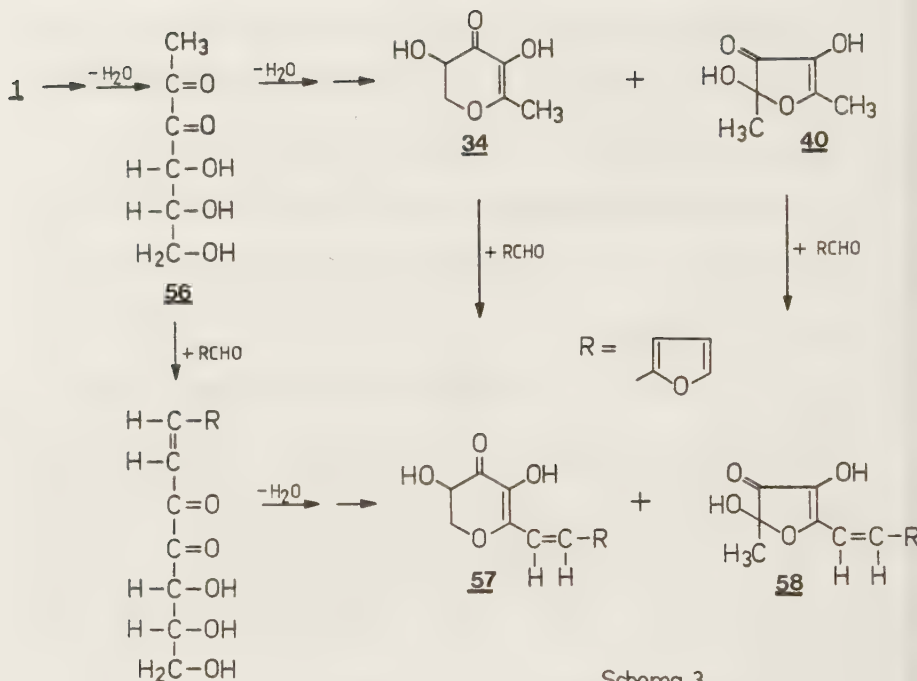


Es handelt sich dabei um Pyrrolderivate mit einer Kohlenstoffkette zwischen 6 und 12 Atomen. Ihre Entstehung aus dem C_6 -Zuckergerüst läßt sich nur durch eine C,C-Spaltung mit anschließender Neuverknüpfung der kondensationsfreudigen Bruchstücke (z.B. Methylglyoxal, Glykolaldehyd) erklären. Da die zur Spaltung der Kohlenstoffkette führende

Retroaldolreaktion nur im Alkalischen in nennenswerten Umfang stattfindet, ist die Bildung dieser Substanzen auch nur bei entsprechenden Bedingungen zu erwarten.

Farbige Verbindungen mit intakter C-Kette konnten bisher aus Hexose-Bräunungsansätzen nicht isoliert werden. Durch Umsetzung von Amadoriprodukten mit reaktiven Carbonylverbindungen gelang es jedoch, die Strukturen einiger methylenaktiver Kondensationspartner zu ermitteln. Man ging dabei von den leicht zugänglichen Amadoriverbindungen sekundärer Amine aus, die - wie bereits erwähnt - bevorzugt über die 1-Deoxy-2,3-diketohexosulose abgebaut werden. Charakteristisch für diesen Reaktionsweg ist die Bildung von Produkten mit einer endständigen Methylgruppe, die in vielen Fällen durch den Einfluß einer Carbonylfunktion acidifiziert ist.

Nach Umsetzung des Amadoriproduktes aus Glucose und Piperidin mit Furfurol gelang es Ledl und Severin⁴⁰, die tiefgelben Substanzen 57 und 58 zu isolieren. Die Frage, ob die 1-Deoxyverbindung zunächst kondensiert und dann im Restmolekül cyclisiert oder ob umgekehrt erst durch Cyclisierung die bekannten Abbauprodukte 34 und 40 entstehen, die dann mit Furfurol kondensieren, bleibt offen. Die Substanzen 57 und 58 sind Beispiele dafür, daß Hexosen in 1-Stellung über die Bildung der 1-Deoxy-2,3-Dicarbonylverbindungen als methylenaktive Komponenten zur Kondensation mit Carbonylverbindungen befähigt sind und dabei farbige Systeme entstehen können.

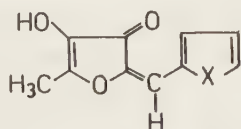


Schema 3

3. Farbige Verbindungen aus Pentosen

Pentosen spielen in Lebensmitteln nur eine untergeordnete Rolle. In Modellversuchen werden sie häufig verwendet, da sie weitgehend analog zu den Hexosen reagieren, jedoch eine höhere Reaktivität aufweisen und ihre Abbauprodukte unpolarer und somit leichter isolierbar sind. Das ist der Grund dafür,

daß die ersten farbigen Zuckerumwandlungsprodukte, die isoliert werden konnten (59a-c), aus Pentose-Modellansätzen stammen^{4,5,41}. Dazu fand man bisher noch eine weitere gelbe Verbindung, die jedoch nur in sehr geringen Mengen mit sekundären Aminen gebildet wird und deshalb von geringerer Bedeutung ist⁴².



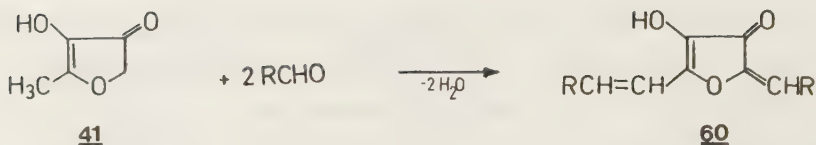
59a,b,c

a: X=O

b: X=NCH₃

c: X=NCH₂COOH

59a/b konnten aus wäßrigen Xylose-Bräunungsgemischen mit Methylammonacetat, 59c mit Glycin als Aminkomponente isoliert werden. Wie aus den Strukturen zu ersehen ist, treten als Bausteine dieser gelben Verbindungen die niedermolekularen Hauptprodukte 41 und 53 des Pentoseabbaus auf. Dabei hat die Aldehydgruppe von 53 mit der CH-aciden Methylengruppe von 41 kondensiert, was einer C1/C5-Verknüpfung der zugrundeliegenden Pentosemoleküle entspricht. Liegt der Aldehyd im Überschuß vor, so kann das Biskondensationsprodukt 60 gebildet werden⁴¹.



Die Methylgruppe des Dihydrofuranons (gebildet aus der C1-Gruppe der Pentose) wird offenbar durch die Ketogruppe über die Doppelbindung hinweg genügend aktiviert.

Die vorliegenden Ergebnisse aus Modellsystemen zeigen somit, wie bestimmte Positionen am Zuckermolekül durch Abbaureaktionen aktiviert werden, so daß an ihnen Kondensationsreaktionen erfolgen. Als Carbonylkomponenten kommt dabei vermutlich den über den 3-Deoxy-1,2-diketoweg gebildeten reaktionsfähigen Aldehyden (also der C1-Position des Zuckers) die größte Bedeutung zu. Als methylenaktives Zentrum konnte bei Pentosen die 5-Stellung, bei Pentosen und Hexosen die 1-Stellung des Zuckergerüsts aufgezeigt werden, die über den 1-Deoxy-2,3-diketoweg aktiviert wurde.

Es lag deshalb nahe zu untersuchen, ob Zucker, die über die 3-Deoxyform abgebaut werden, analog an der stark aktivierten Methylengruppe in 3-Stellung zu farbigen Produkten kondensieren.

Der 3-Deoxyabbauweg wird vor allem bei der Umsetzung von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren in schwach saurem Medium besprochen (siehe S. 47). Entscheidende Bedeutung kommt dabei der Bildung des "dimeren" Amadoriproduktes 54

zu, da dieses leicht zu den 3-Deoxy-1,2-dicarbonylverbindungen zerfällt. Wie Heyns und Mitarbeiter⁴³ in ihren ausführlichen Studien festgestellt haben, liegt ein Maximum an dimerem wie auch an monomerem Amadoriprodukt in einem methanolischen Glucose/Glycin-Gemisch nach 12-stündigem Erhitzen vor. Diese Reaktionsbedingungen dienten als Grundlage für meine Untersuchungen.

4. Umsetzung von Xylose mit Glycin

Ich erhitzte eine methanolische Lösung von D-Xylose und L-Glycin (Molverhältnis 4:1) unter Rückfluß. Nach 12 Std setzte ich dem Reaktionsgemisch einen Überschuß an Furfurol zu, um die schon gebildeten bzw. in der Folgezeit entstehenden methylenaktiven Verbindungen durch Kondensation abzufangen. Durch Konzentrationserhöhung des bei diesen schwach sauren Bedingungen ohnehin aus Xylose entstehenden Furfurols sollten Kondensationen von konkurrierenden reaktionsfähigen Carbonylverbindungen in den Hintergrund gedrängt werden. Nach weiterem 12-stündigem Erhitzen wurde die dunkelbraune Lösung aufgearbeitet. Dazu entfernte ich das Methanol, nahm den Rückstand in Wasser auf und extrahierte mit Methylenchlorid. Den Extrakt gab ich auf eine Kieselgelsäule, eluierte mit Ether und sammelte die schnellaufende gelbe Fraktion. Die weitere Reinigung auf präparativen Kieselgel-Schichtplatten ergab eine breite gelbe Zone, die auf das

Vorliegen mehrerer farbiger Substanzen schließen ließ. Tatsächlich erhielt ich nach anschließender Trennung an Kieselgel-Dünnschichtplatten (Fließmittel: Toluol/Essiges-ter 8+1) zwei vollständig voneinander getrennte gelbe Zonen mit Rf-Werten von 0,64 und 0,57. Ihre Elution mit Methylenchlorid ergab zwei gelbe Öle, wobei die Substanz aus der unteren Zone mengenmäßig überwog.

Als sehr aufschlußreich erwies sich ein Ansatz ohne Furfurolzugabe: wiederum konnten beide farbige Substanzen isoliert werden, jedoch in deutlich geringerer Menge. Da nur noch das aus der Xylose gebildete Furfurol für die Kondensation zur Verfügung stand, kondensierten auch andere, eventuell reaktivere Carbonylverbindungen aus dem Gemisch mit der unbekannten CH-aciden Komponente.

Der Furfurolzusatz ermöglichte es, daß ich schon nach Umsetzung einer relativ geringen Menge Xylose (ca. 80 g) genügend Substanz für die zur Strukturaufklärung benötigten Spektren erhalten konnte. Schwierigkeiten bereitete die Tatsache, daß sich die Verbindungen, besonders in Lösung, innerhalb kurzer Zeit ineinander umwandeln. Die daraus abgeleitete Vermutung, es handle sich um cis/trans-Isomere, wurde durch die beinahe identischen Massenspektren bestärkt ($M^{+}206$). Die IR-Spektren zeigten ebenfalls keine aussagekräftigen Unterschiede. Am interessantesten erschien jeweils die relativ schwache Carbonylbande bei 1705 cm^{-1} ,

die auf ein gesättigtes oder α,β -ungesättigtes Keton hindeutete. Die Messung der UV-Absorptionen ergab gleiche Maxima (390, 267 nm), die ϵ -Werte wichen nur geringfügig voneinander ab. Aus den NMR-Spektren ging eindeutig hervor, daß beide Substanzen 10 H-Atome besitzen. Davon gehören 3 einer OCH_3 -Gruppe an (Singulett bei $\delta = 3,60$ ppm), die auf den Einbau des Lösungsmittels Methanol ins Molekül zurückzuführen ist. Ein Signal (Singulett, $\delta = 5,10$ ppm, 1H) ist in seiner Lage typisch für ein Acetal-H mit benachbarter elektronenziehender Gruppe.

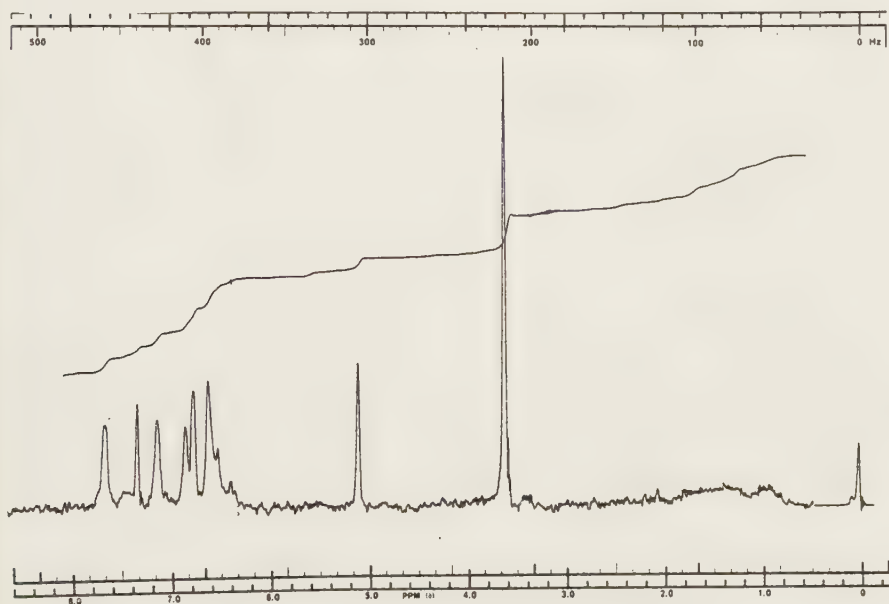


Abb. 10: NMR-Spektrum von 63a in CDCl_3

Ein unterschiedliches Bild ergaben die beiden Substanzen dagegen im Bereich zwischen 5,5 und 8,0 ppm, wobei die Interpretation wegen einiger unaufgelöster Signale schwierig war.

Abb. 10 zeigt das NMR-Spektrum der mengenmäßig überwiegenden Substanz mit geringerem Rf-Wert, Abb. 11 das des darüberliegenden Isomeren.

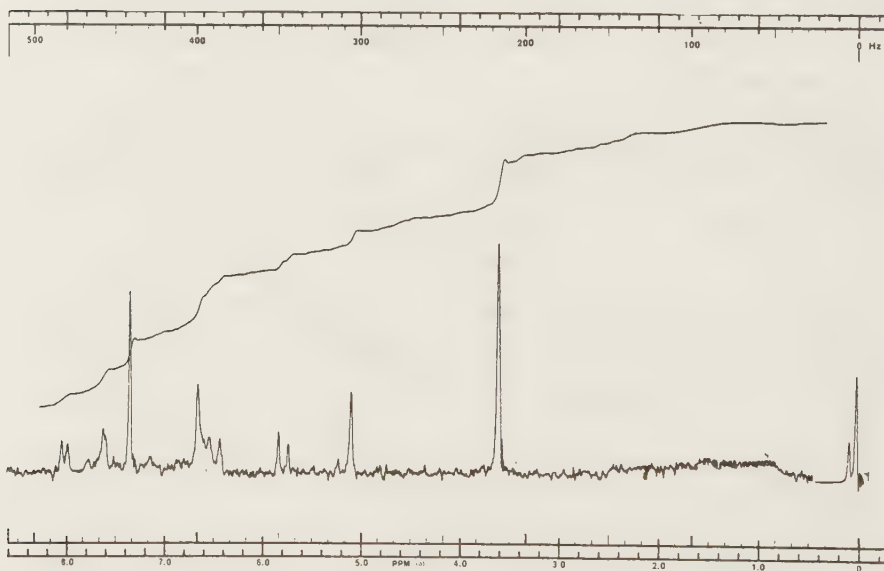
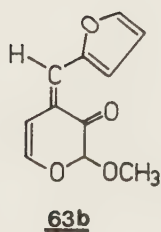
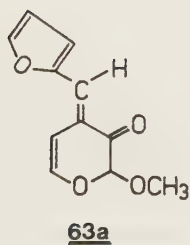
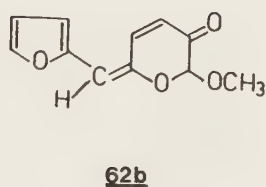
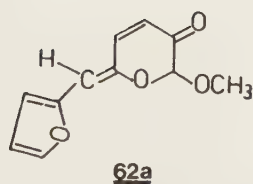
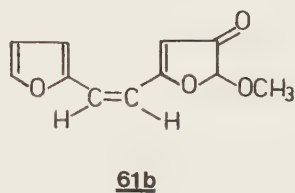
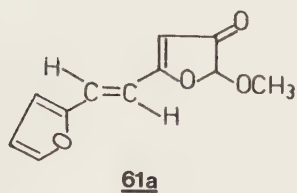


Abb. 11: NMR-Spektrum von 63b in CDCl_3

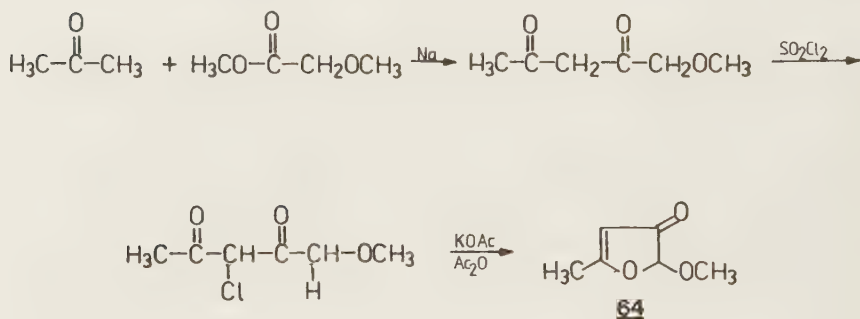
Da feststand, daß jeweils ein Molekül Furfurol durch Kondensation an der Bildung der Substanzen beteiligt war, blieben von den sechs Protonen im olefinischen Bereich noch drei

für das Restmolekül übrig. Aufgrund der Spektren kamen als mögliche Strukturen die drei Isomerenpaare 61a/b, 62a/b und 63a/b in Frage:



Die Bildung sowohl des β -Furanon-Strukturelements von 61, wie des β -Pyranon-Strukturelements von 62 und 63 (beide sind identisch) wären aus der Pentose möglich. Welche der Verbindungen nun tatsächlich vorlagen, sollte eine unabhängige Synthese zeigen.

Das β -Furanon 64 läßt sich nach einer Vorschrift von Henecka⁴⁴ relativ leicht und in guter Ausbeute aus Methoxyessigsäuremethylester und Aceton herstellen:



Wie frühere Versuche an ähnlichen Substanzen (z.B. 41) zeigten, ist die Methylgruppe in 5-Stellung durch die Wirkung der Ketofunktion über die Doppelbindung hinweg acidifiziert. Die Umsetzung von 64 mit Furfurol in Gegenwart katalytischer Mengen Piperidin ergab wie erwartet das kristalline, gelbe Kondensationsprodukt 61a. Dieses unterschied sich in allen Spektren eindeutig von den isolierten Verbindungen.

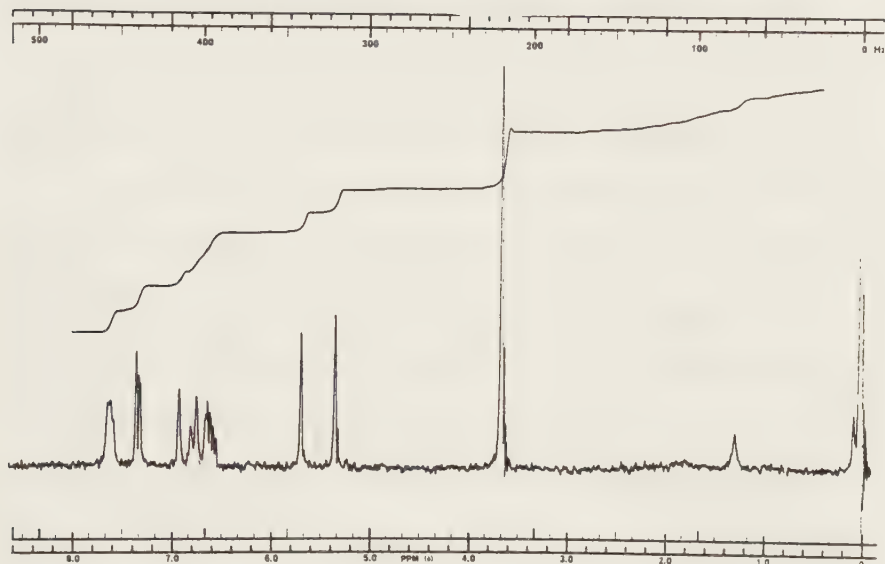
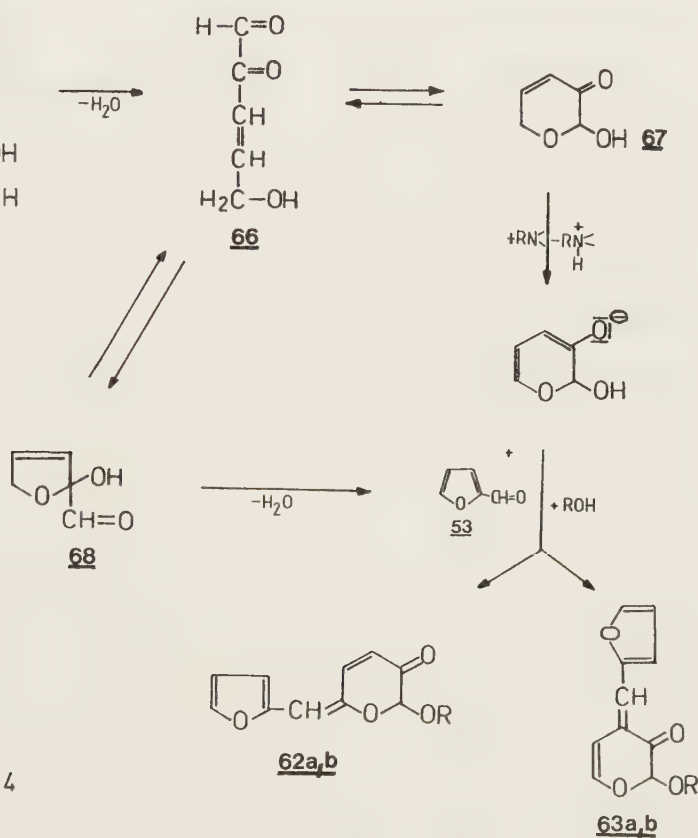


Abb. 12: NMR-Spektrum von 61a in CDCl_3

Somit kamen als mögliche Strukturen nur noch die zwei Isomerenpaare 62a/b und 63a/b in Frage. Beide weisen als CH-acide Komponente das gleiche β -Pyranon auf; bei 62a/b ist das Furfurol in C5-Stellung ankondensiert, bei 63a/b dagegen in C3-Stellung des β -Pyranonringes. Nur eine der beiden Kondensationsmöglichkeiten ist realisiert, da sich die Substanzen ineinander umwandeln. Um welchen Typ es sich handelte, war schwer zu entscheiden; jedoch gab das NMR-Spektrum des in geringerer Menge gebildeten Isomeren einen Hinweis. Überraschenderweise erscheint darin das Dublett für das β -Furan-H

mit seiner charakteristischen Kopplungskonstanten von 3,5 Hz nicht wie bei anderen Furanen bei ca. 6,8 ppm, sondern bei 8,03 ppm. Diese beträchtliche Tieffeldverschiebung kann nur in der räumlichen Struktur des Moleküls begründet sein: in unmittelbarer Nähe des β -Furan-H-Atoms sollte sich eine stark entschirmend wirkende funktionelle Gruppe befinden. Von den vier in Frage kommenden Strukturen weist nur 63b entsprechende sterische Verhältnisse auf: da sich die Konjugation über das gesamte Molekül erstreckt, ist eine ebene Anordnung der beiden Ringe energetisch begünstigt. Dabei liegt das β -Furan-H-Atom in enger Nachbarschaft zur Carbonylgruppe des β -Pyranons und wird deshalb von deren starkem elektromagnetischem Feld beeinflusst. Dieser Feldeffekt deutete somit darauf hin, daß die C3-Furfuryliden-Pyranonderivate vorliegen. Das E-Isomere 63a zeigt dagegen die paramagnetische Verschiebung nicht, da der Furanring und die Ketogruppe an der exocyclischen Doppelbindung in trans-Stellung angeordnet sind. Da sie sich gegenseitig nicht behindern, ist diese Form bevorzugt. Beide Isomere wandeln sich leicht ineinander um, so daß in Lösung ein Gleichgewicht vorherrscht. Als Grund für die starke Isomerisierungsneigung ist wohl das Strukturelement einer α,β -ungesättigten aromatischen Carbonylverbindung anzusehen. Von diesen Verbindungen wie z.B. Chalkonen oder Zimtsäureestern ist bekannt, daß sie leicht cis/trans-Isomerisierungen unterliegen.

β -Pyranone sind bisher als Zuckerumwandlungsprodukte nicht beschrieben. Das 2-Hydroxy-2H-pyran-3-(6H)on 67, das den farbigen Verbindungen 62 und 63 zugrundeliegt, sollte jedoch leicht aus einer Pentose gebildet werden können.



Schema 4

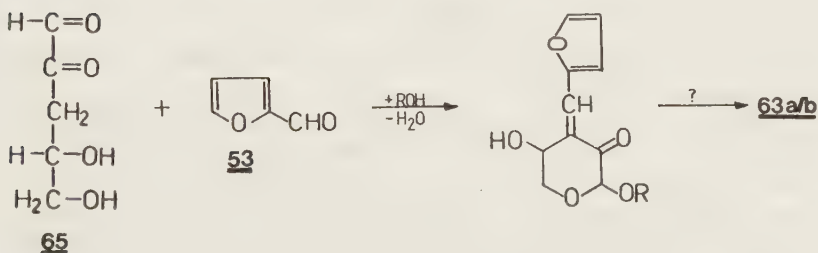
Wie in Schema 1 dargestellt, entsteht aus Xylose durch Umsetzung mit Aminosäuren in großer Menge die 3-Deoxypentose 65, die schnell auf vielfältige Weise weiterreagiert. Leicht kann ein Molekül Wasser abgespalten werden, was zum ungesättigten 3,4-Dideoxyprodukt 66 führt. Da benachbarte Carbonylfunktionen eine hohe Additionsneigung besitzen, liegt 66 (wie auch 65) kaum in der offenkettigen Form, sondern vielmehr als cyclisches Halbacetal vor. Erfolgt die Addition der C5-OH-Gruppe an der C2-Ketogruppe, so entsteht das Furan-derivat 68, das nach Wasserabspaltung Furfurol (53), ein Hauptprodukt des Pentoseabbaus, ergibt.

Ebenfalls möglich ist jedoch auch eine Cyclisierung zum β -Pyranon 67. Aus diesem läßt sich, bedingt durch die acidifizierende Wirkung der Ketogruppe, in C5-Stellung ein Proton ablösen. In dieser Position, wie auch in C3-Stellung, kann anschließend die Kondensation des Furfurol erfolgen, wobei die NMR-Spektren der isolierten Substanzen auf 63a/b hindeuten.

Ebenso wie 67 sind auch die Kondensationsprodukte labile und schwer isolierbare Halbacetale. Durch Reaktion mit dem als Lösungsmittel verwendeten Alkohol zum Vollacetal kann jedoch eine Stabilisierung des Gesamtmoleküls erfolgen. Die isolierten Produkte weisen jedenfalls in C1-Stellung die den Alkoholen entsprechenden Alkoxygruppen auf. Ethanol als Lösungsmittel lieferte die analogen Ethoxyverbindungen. Die Voll-

acetalbildung kann vor oder nach der Kondensation stattfinden.

Für die 3-Furfurylidenpyranone ist noch ein weiterer Bildungsweg zu diskutieren. Die Kondensation des Furfurol könnte nämlich nicht erst an der 3,4-Dideoxypentenulose (66), sondern schon an seiner Vorstufe, der 3-Deoxyverbindung 65 stattfinden. Nach Cyclisierung entsteht wieder ein β -Pyranon, das allerdings in C4-Position eine OH-Gruppe aufweist. Deren Abspaltung ist jedoch nach dem für den Zuckerabbau typischen β -Eliminierungsmechanismus nicht mehr möglich: die exocyclische Doppelbindung verhindert eine C2/C3-Enolisierung der Ketofunktion, so daß die β -ständige OH-Gruppe nicht mehr "hinausgeschoben" werden kann. Ihre Abspaltung sollte dennoch erfolgen können, da der Furanring über die allylständige Doppelbindung als Elektronendonator wirkt.



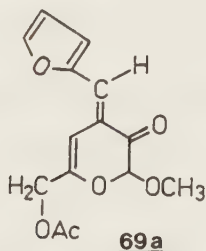
Als plausibler erscheint jedoch der in Schema 4 aufgezeigte Reaktionsweg.

Den endgültigen Beweis, daß es sich bei den isolierten Substanzen um die 3-Furfurylidenpyranone handelt, liefern die analogen Hexoseprodukte.

5. Umsetzung von Glucose mit Glycin

Die Bildung von β -Pyranonen sollte auch aus den lebensmittelchemisch bedeutenderen Hexosen möglich sein. Ich setzte deshalb in gleicher Weise D-Glucose mit L-Glycin in Methanol um. Nach 12 Std gab ich wieder Furfurol in Überschuß zu und erhitze weitere 12 Std. Dann extrahierte ich das Reaktionsgemisch mit Methylenchlorid und fraktionierte den Extrakt säulenchromatographisch. Die anschließende Chromatographie an präparativen Kieselgelplatten ergab eine gelbe Zone, die neben gelben Substanzen auch noch fluoreszenzlöschende Komponenten enthielt. Wie erwartet waren die Laufeigenschaften im Vergleich zu denen der Pentoseprodukte deutlich schlechter (Hexosen enthalten eine OH-Gruppe mehr). Zur weiteren Reinigung setzte ich das Substanzgemisch mit Acetanhydrid um. Die acetylierten farbigen Produkte wiesen größere R_f -Werte auf und konnten so von den Begleitsubstanzen abgetrennt werden. Wie bei den Pentoseprodukten erhielt ich zwei dicht nebeneinander liegende gelbe Zonen, wobei ebenfalls die untere mengenmäßig deutlich überwog. Da die Ausbeute bei den

Hexoseansätzen erheblich geringer war, beschränkte ich mich auf die Untersuchung des Hauptprodukts; von der zweiten Substanz fertigte ich nur ein Massenspektrum an. Beide Produkte ergaben fast identische MS-Spektren mit der erwarteten Molekülmasse von 278. Somit war anzunehmen, daß es sich um die cis/trans-isomeren β -Pyranonderivate 69a/b handelte. Dafür sprach auch die große Ähnlichkeit der übrigen Spektren von 69a mit denen des Pentosehauptprodukts 63a: das IR-Spektrum wies als einzigen markanten Unterschied die durch die Acetylgruppe bedingte Carbonylbande bei 1740 cm^{-1} auf, die Messung der UV-Absorption ergab beinahe identische Maxima und ϵ -Werte.



Im NMR-Spektrum erscheinen zusätzlich zwei Singuletts bei $\delta = 2,16\text{ ppm}$ (3H) und $\delta = 4,70\text{ ppm}$ (2H), die einer acetylierten Hydroxymethylgruppe zuzuordnen sind. Diese befindet sich am C5-Atom des aus der Glucose gebildeten β -Pyranons. In dieser Position ist somit keine Kondensationsreaktion möglich. Deshalb kommt als Struktur für das isolierte Haupt-

produkt nur noch das C3-Furfurylidenpyranon 69a in Frage.

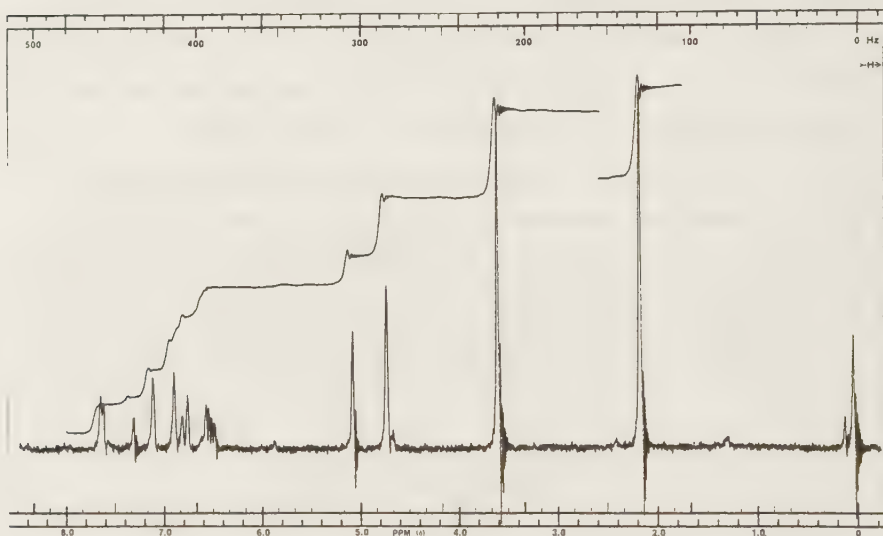
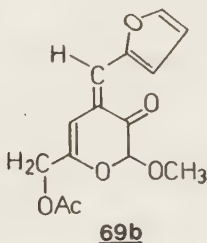


Abb. 13: NMR-Spektrum von 69a in CDCl_3

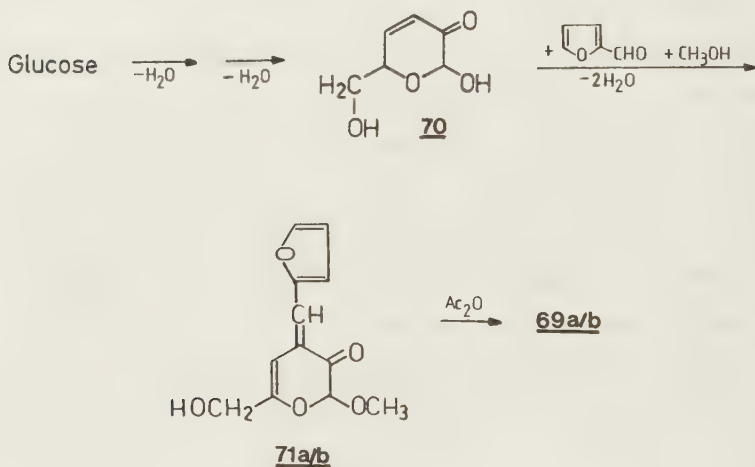
69a besitzt im Vergleich zum entsprechenden Pentoseprodukt 63a ein olefinisches Proton weniger. Durch das Fehlen dieses Signals ist das Spektrum in diesem Bereich übersichtlicher und läßt nun eine eindeutige Interpretation zu. Deutlich ist der Furanring mit drei benachbarten H-Atomen zu erkennen. Dafür charakteristisch sind die bei $\delta = 6,50$, $\delta = 6,76$ und $\delta = 7,63$ ppm zentrierten Signalgruppen mit ihren Kopplungskonstanten von $J = 2$ Hz und $J = 3,5$ Hz. Die beiden

dazwischen liegenden Singulettts sind der exocyclischen Methingruppe ($\delta = 7,10$ ppm) und der des Pyranringes ($\delta = 6,87$ ppm) zuzuordnen. Im Vergleich zu den erwarteten Werten weisen beide Signale eine beträchtliche Tieffeldverschiebung von 0,5-1 ppm auf. Der Grund dafür liegt in der räumlichen Struktur von 69a. Aufgrund der begünstigten ebenen Anordnung der beiden Ringe befindet sich das C4-Pyran-Proton unmittelbar neben dem aromatischen Furanring und wird deshalb von diesem stark entschirmt. In ähnlicher Weise beeinflußt auch die Ketogruppe das räumlich benachbarte exocyclische Proton. Diese Feldeffekte weisen darauf hin, daß das farbige Hauptprodukt die abgebildete E-Form besitzt. Das Z-Isomere 69b liegt in geringerer Menge vor.



Die Bildung von 69a/b erfolgt über denselben Weg wie die der Pentoseprodukte. Unter den Reaktionsbedingungen geht Glucose in die 3,4-Dideoxy-1,2-diketohexenulose über, die bevorzugt in der cyclischen Halbacetalform 70 vorliegt. Durch Deprotonierung am C5-Atom entsteht ein resonanz-

stabilisiertes Anion, das in C3-Stellung mit dem zugesetzten Furfurol kondensiert. Das Lösungsmittel Methanol stabilisiert die Kondensationsprodukte als Vollacetale 71a/b. Nach Acetylierung lassen sich die Isomere 69a/b isolieren.



Die Struktur von 69a/b konnte durch eine unabhängige Synthese bewiesen werden.

6. Synthese der farbigen Hexoseprodukte

Bei der Pyrolyse von Kohlenhydraten entsteht neben Kohle und Teerprodukten eine Vielzahl flüchtiger Substanzen, darunter auch die 1,6-Anhydro-3,4-dideoxy-D-glycero-hex-3-enopyranos-2-ulose 72⁴⁵. Unter geeigneten Bedingungen (400°C, Normaldruck, Stickstoffatmosphäre) läßt sich 72 aus säurebehandelter Cellulose in Ausbeuten bis zu 4% isolieren.

Mit Acetanhydrid und Bortrifluorid wird der Furanring gespalten und man erhält als Hauptprodukt das β -Pyranon 73. Ebenso wie die 3,4-Dideoxy-1,2-diketohexenulose selbst sollte auch dieses cyclische Bisacetylderivat mit Furfurol zu farbigen Produkten kondensieren.

Ich setzte deshalb 73 in Methanol mit Furfurol und Glycin als Katalysator um. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung des Reaktionsgemisches erhielt ich zwei dicht benachbarte gelbe Zonen. Die untere von beiden lieferte ein gelbes Öl, dessen Spektraldaten mit denen des isolierten Zuckerumwandlungsproduktes 69a identisch waren. Die obere Zone enthielt wie erwartet das Z-Isomere 69b.

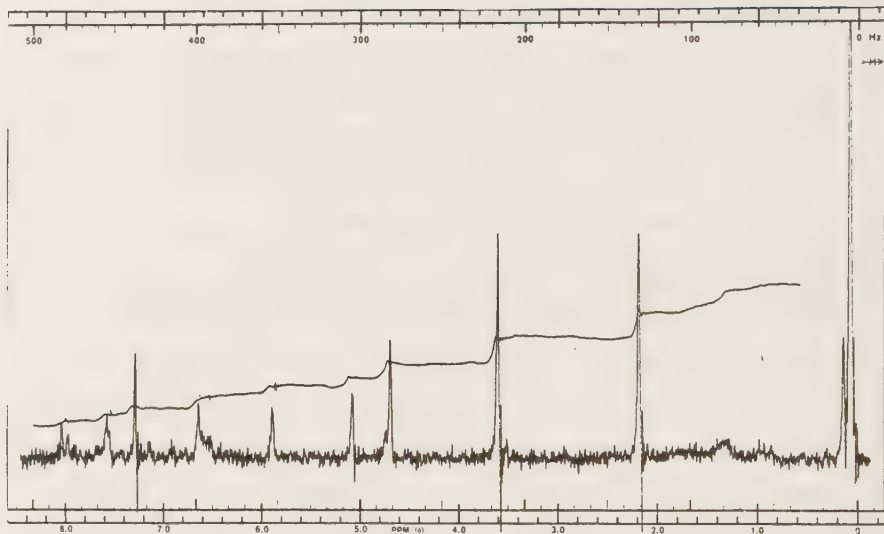
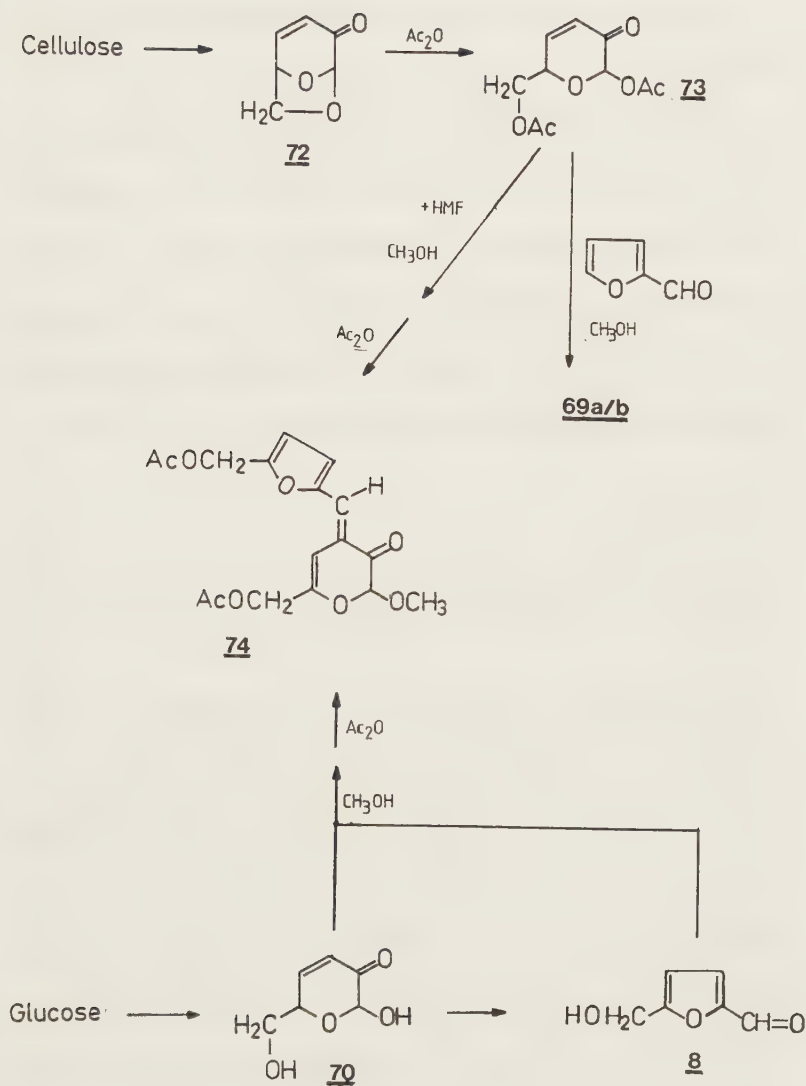


Abb. 14: NMR-Spektrum von 69b in CDCl_3

Die NMR-Spektren der beiden synthetisierten Verbindungen entsprechen denen der aus den Xyloseansätzen isolierten Pento-seprodukte. Somit ist auch deren Struktur eindeutig als 63a/b bewiesen.

Bemerkenswert am Reaktionsverlauf der Synthese ist, daß neben der Kondensation und der damit verbundenen Isomerisierung der Doppelbindung auch noch die acetalische Acetoxygruppe durch den Alkoxyrest des alkoholischen Lösungsmittels ersetzt wird. Dieser Austausch bewirkt eine entscheidende Stabilisierung des Moleküls. Verhindert man ihn, indem man die Kondensation im Aprotischen durchführt, dann läßt sich das



Scheme 5

entsprechende Cl-Acetoxypunkt nicht in nennenswerter Menge isolieren.

Die Umsetzung von 73 mit Hydroxymethylfurfurol (HMF, 8) führt nach anschließender Acetylierung zu Verbindung 74.

Da HMF in großer Menge aus Glucose gebildet wird, kann es im Hexoseansatz die Rolle des zugesetzten Furfurol übernehmen und mit dem β -Pyranon 70 kondensieren.

Tatsächlich konnte ich in einem methanolischen Glucose/Glycin-Bräunungsansatz nach Acetylierung geringe Mengen an Kondensationsprodukt 74 massenspektrometrisch nachweisen.

7. Diskussion

Unter welchen Bedingungen erfolgt die Bildung der farbigen β -Pyranone? Ist mit ihrem Vorkommen auch in Lebensmitteln zu rechnen?

β -Pyranone können grundsätzlich immer dann entstehen, wenn Zucker über die 3-Deoxyverbindungen abgebaut werden. Wie frühere Untersuchungen zeigen¹², spielt dieser Abbauweg sowohl bei Mono- als auch bei Disacchariden eine entscheidende Rolle. Ich setzte neben Xylose und Glucose auch Fructose und Rhamnose um. Fructose lieferte geringere Ausbeuten an 69a als Glucose. Auch aus einem methanolischen Rhamnose/Glycin/Furfurol-Ansatz konnte ich eine gelbe Verbindung isolieren. Sie wies das Molekulargewicht des erwarteten C5-Methyl- β -Pyranonderivates auf.

Ich führte die Bräunungsreaktionen in Gegenwart von Aminosäuren durch, da diese den Zuckerabbau über den 3-Deoxyweg begünstigen. Welche Aminosäure vorliegt, scheint von untergeordneter Bedeutung: Lysin lieferte dieselben Ergebnisse wie Glycin.

Die große Menge an Furfurol bzw. HMF, die beim Karamelisieren von Pentosen bzw. Hexosen gebildet wird, läßt vermuten, daß auch unter diesen Bedingungen β -Pyranone entstehen.

Einen großen Einfluß auf die β -Pyranonbildung übt der pH-Wert aus. Als optimal erwiesen sich schwach saure Bedingungen (pH 5-6), die aufgrund der Pufferwirkung der Peptide in vielen Lebensmitteln vorherrschen. Mit steigendem pH-Wert geht die Ausbeute immer mehr zurück. Im schwach Alkalischen (pH 7-8) konnten die beschriebenen farbigen Verbindungen nicht mehr nachgewiesen werden.

Auch das Lösungsmittel, in dem die Umsetzung des Zuckers erfolgt, spielt eine Rolle, vermutlich jedoch weniger für die Bildung der β -Pyranone, als vielmehr für ihre Stabilisierung. Alkohole (Methanol, Ethanol) ergaben die besten Ausbeuten, Alkohol/Wasser-Gemische entsprechend geringere. In beiden Fällen ist eine Stabilisierung des Moleküls als Vollacetal möglich. In dieser Form sind die β -Pyranone reaktionsträge und somit als Endprodukte anzusehen. Die alkoholisch/wäßrigen Lösungen dürften ein realistisches Modell für wasserärmere Lebensmittel darstellen. In diesen kann

die Funktion der Alkoxygruppen von Kohlenhydrat-OH-Gruppen übernommen werden.

Auch in rein wäßrigen Lösungen sollte die Bildung der farbigen β -Pyranone erfolgen. Da eine Stabilisierung als Acetal nicht möglich ist, gehen sie vermutlich weitere Folgereaktionen ein und sind deshalb nicht isolierbar. Als α -Dicarbonylverbindungen können sie z.B. leicht mit CH-aciden Substanzen kondensieren, eventuell mit einem β -Pyranon vom Typ 70. Somit sind die β -Pyranone auch als bifunktionelle Bausteine bei der Bildung der höhermolekularen Melanoidine anzusehen.

D) Zusammenfassung

Im Verlauf des thermischen Zuckerabbaus erfolgt die Bildung einer Vielzahl von Substanzen. Während die leichtflüchtigen unter ihnen mittels GC/MS-Kombination eingehend analysiert sind, mangelt es an Methoden zum Nachweis der mengenmäßig überwiegenden hydrophilen und höhermolekularen, z.T. farbigen Produkte.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit Derivatisierungsverfahren, die bei der gaschromatographischen Bestimmung von Zuckern Anwendung finden, auch für die Analytik von Abbauprodukten geeignet sind. Primär von Interesse war dabei der Nachweis von hydrophilen und reaktiven C,C-Spaltprodukten (Glycerinaldehyd (5), Dihydroxyaceton (6), Erythrose (4), Glykolaldehyd (3) und Methylglyoxal (7)), die aus Zuckern durch Retroaldolreaktionen entstehen können. Durch Umsetzung mit O-Methylhydroxylamin zu Oximen und anschließende Acetylierung war es möglich, diese Verbindungen und auch noch weitere (Hydroxymethylfurfurool (8), Hydroxyacetylfuran (32), 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranon (34), 3-Deoxyhexosulose (36), Glucose (1) und Fructose (2)) in nahezu quantitativer Ausbeute in gaschromatographisch gut trennbare Derivate überzuführen. Dieses Verfahren erwies sich auch für den Nachweis der Substanzen in komplexen, wasserhaltigen Reaktionsgemischen als geeignet. Durch seine Anwendung auf verschiedene Bräunungsansätze konnte gezeigt werden, daß

Retroaldolreaktionen vor allem unter alkalischen Bedingungen stattfinden, in geringerem Umfang auch bei Maillard-Reaktionen im neutralen Bereich, dagegen praktisch nicht beim Karamelisieren im Neutralen oder schwach Sauren. Ferner gelang mit Hilfe des Verfahrens der Nachweis von Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton in Brezenkruste.

Unter den Zuckerumwandlungsprodukten befinden sich auch Substanzen mit ausgeprägtem Reduktionsvermögen: Reduktone und Aminoreduktone. Für das C4-Aminoreduktion (45a) gibt es seit kurzem ein spezifisches und empfindliches Nachweisverfahren⁴⁶. Nach Umsetzung mit Methylhydrazin erhält man die isomeren Hydroxypyrazole 46a/b, die gaschromatographisch gut bestimmbar sind. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, daß relativ große Mengen an C4-Aminoreduktion beim trockenen Erhitzen von Glucose mit Glycin auf Temperaturen von über 100°C, vor allem aber unter alkalischen Umsetzungsbedingungen gebildet werden. Geringe Mengen wurden auch in dunklem Malz nachgewiesen. Die Anwendung der Derivatisierung auf das Zuckerumwandlungsprodukt Diacetylformoin (40) ergab die gut bestimmbaren Verbindungen 47a/b und 48, über die der Nachweis von 40 in verschiedenen Zucker/Aminosäure-Bräunungsgemischen, in Brezenkruste und dunklem Malz möglich war.

Die Bildung farbiger Zuckerumwandlungsprodukte erfolgt im wesentlichen durch Kondensationsreaktionen zwischen Carbonyl-

verbindungen und methylenaktiven Substanzen.

Nach Zusatz von Furfurol zu methanolischen und methanolisch/wäßrigen Xylose/Glycin- und Glucose/Glycin-Bräunungsgemischen konnten die gelben β -Pyranone 63a/b und 69a/b isoliert werden. Verbindungen dieses Typs sind bisher als Zuckerumwandlungsprodukte nicht beschrieben. Ihre Struktur wurde durch eine unabhängige Synthese, ausgehend von einem Cellulose-Pyrolyseprodukt, bewiesen.

In entsprechenden Bräunungsansätzen ohne Furfurolzugabe konnte wiederum 63a/b, sowie das Hexoseprodukt 74 nachgewiesen werden.

Experimenteller Teil

Allgemeine Methoden

Schichtchromatographie

DC-Alufolien, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm, Fa. Merck

PSC-Fertigplatten, Kieselgel, Merck F₂₅₄, Schichtdicke 2 mm

Säulenchromatographie

Kieselgel, Silica Woelm TSC Aktivität 111/30 mm

Gaschromatographie

Hewlett Packard 5830 A Gas Chromatograph

GC/MS-Kopplung

Varian Aerograph Series 2800 gekoppelt mit Massenspektrometer Varian MAT CH 7; Ionenquelle: 230°C, gemessen bei 70 eV

Massenspektrometer

Varian CH 7 Mass-Spektrometer (70 eV, Ionenquelle: 230°C)

IR-Spektrometer

Perkin-Elmer 257 Grating Infrared Spektrophotometer

UV-Spektrometer

Beckmann Spektrophotometer 25

¹H-NMR-Spektrometer

Varian T 60 NMR Spektrometer (60 Hz)

A) Analytik der niedermolekularen, hydrophilen Zuckerabbauprodukte

Sämtliche in diesem Abschnitt beschriebenen gaschromatographischen Untersuchungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule : Stahlsäule 2,5% SE 52 80/100 mesh, Chromosorb G
Ofentemperatur : 60⁰-260⁰C; Aufheizrate: 4⁰/min
Injektortemperatur: 280⁰C
Detektortemperatur: 280⁰C
Gasdurchfluß : 30 ml/min

1. Acetylierung

1.1 Acetylierung von D-Glucose (1) mit Acetanhydrid/Pyridin

0,3 g α -D-Glucose in 10 ml trockenen Pyridin lösen und mit 3 g Acetanhydrid 10 Std bei Raumtemperatur rühren. 30 ml Eiswasser zugeben und mehrmals mit Methylenchlorid ausschütteln. Den organischen Extrakt nach Entfernung des Lösungsmittels am Hochvakuum (0,1 Torr) destillieren. Ab ca. 120⁰C scheiden sich in der Destillationsbrücke farblose Kristalle ab.

9: Smp: 112⁰C, Retentionszeit im Gaschromatogramm (RT) ca. 43 min, Spektren stimmen mit denen in der Literatur überein^{14,47}.

1.2. Acetylierung von D-Glucose (1) mit Acetanhydrid/NaAc

0,3 g wasserfreie α -D-Glucose mit 3 g Acetanhydrid, 0,3 g Natriumacetat und 10 ml Chloroform 1 Std unter Rückfluß erhitzen. Erkalten lassen, 30 g Eiswasser zugeben, 1 Std rühren und anschließend mit Methylenchlorid ausschütteln. Den organischen Extrakt nach Entfernung des Lösungsmittels am Hochvakuum (0,1 Torr) destillieren. Ab ca. 120°C scheiden sich in der Destillationsbrücke farblose Kristalle ab.

10: Smp: 132°C, RT ca. 43 min

Spektraldaten stimmen mit denen in der Literatur überein^{14,47}

1.3. Acetylierung von Dihydroxyaceton (6)

0,3 g Dihydroxyaceton nach Vorschrift 1.2. umsetzen. Die Sublimation des organischen Extrakts im Hochvakuum bei 50°C/0,1 Torr ergibt farblose Nadeln. Gaschromatographisch sind keine Nebenprodukte nachweisbar.

11: Smp: 45°C, RT ca. 14 min

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 2,17(s,6H) 4,69(s,4H)

MS(m/e) : 174(5,M⁺) 115(10) 101(76) 73(48) 43(100)
42(46)

IR(KBr) : 1740, 1405, 1375, 1220, 1020 cm⁻¹

1.4. Acetylierung von Glycerinaldehyd (5)

0,3 g Glycerinaldehyd nach 1.2. umsetzen. HV-Destillation des organischen Extrakts ergibt ein farbloses Öl, das neben

der Hauptkomponente 13 noch einige Nebenprodukte aufweist, u.a. 14.

13 : Kp: 95°C/0,1 Torr, RT ca. 38 min

¹H-NMR(CDC1₃): ppm 2,09(s,12H) 3,85-5,33(m,8H)

MS(m/e) : 289(3) 275(5) 203(39) 145(48) 115(53)
43(100)

IR(KBr) : 1745, 1375,1220, 1050 cm⁻¹

2. Allgemeine Vorschrift für die Umsetzung von Hydroxyaldehyden- und ketonen zu O-Alkyloximacetaten

10 mmol Hydroxylamin- bzw. O-Methylhydroxylamin- bzw. O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid in 20 ml Methanol/Wasser (1+1) lösen und den pH-Wert mit 2N NaOH auf ca. 6,5 einstellen. Dazu 5 mmol Hydroxycarbonylverbindung geben und 1 Std unter Rückfluß erhitzen. Lösungsmittel möglichst vollständig unter vermindertem Druck entfernen, Rückstand mit 15 g Acetanhydrid, 1,5 g Natriumacetat und 20 ml Chloroform versetzen und 1 Std unter Rückfluß erhitzen. Nach Abkühlung der Lösung 100 ml Eiswasser zugeben und 1 Std bei Raumtemperatur rühren; dabei den pH-Wert mehrmals mit 2N NaOH auf 6-7 abstumpfen. Anschließend die organische Phase abtrennen, mit Wasser waschen, über CaCl₂ trocknen und Chloroform abziehen. Leichtflüchtige Nebenprodukte am Hochvakuum (0,1 Torr) bei Raumtemperatur entfernen, danach Rückstand bei der angegebenen Temperatur überdestillieren und gaschromatographisch unter-

suchen. Nach dieser Methode lassen sich die folgenden Derivate (alles farblose Öle) in nahezu quantitativer Ausbeute und weitgehend frei von gaschromatographisch nachweisbaren Nebenprodukten herstellen:

19: Kp: 65°C/0,1 Torr, RT ca. 28 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,12(s,6H) 2,18(s,3H) 4,84(s,2H)
4,99(s,2H)

MS(m/e) : 231(5, M^+) 188(16) 129(60) 128(100) 99(86)
43(93)

IR(NaCl-Film): 1780, 1750, 1430, 1370, 1190 cm^{-1}

20: Kp: 60°C/0,1 Torr, RT ca. 24 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,07(s,6H) 3,93(s,3H) 4,70(s,2H)
4,94(s,2H)

MS(m/e) : 203(12%, M^+) 202(51) 161(11) 101(69) 45(61)
43(100)

IR(NaCl-Film): 2950, 1750, 1380, 1230, 1040, 900, 840 cm^{-1}

21: Kp: 100°C/0,1 Torr, RT ca. 36 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,00(s,6H) 4,67(s,2H) 4,95(s,2H)
5,12(s,2H) 7,30(s,5H)

MS(m/e) : 279(3%, M^+) 177(6) 129(11) 91(100) 77(43)
65(41) 43(70)

IR(NaCl-Film): 2945, 1750, 1455, 1370, 1230, 1035 cm^{-1}

22: Kp: 60°C/0,1 Torr, RT ca. 23 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,01(s,3H) 2,04(s,3H) 3,85 u. 3,91
(jew. s,zus. 3H) 4,25(m,2H) 5,48(m,1H)
6,48 u. 7,19 (jew. m,zus. 1H)

MS(m/e) : 203(8%, M^+) 131(72) 101(73) 89(77) 43(100)

IR(NaCl-Film): 2950, 1750, 1440, 1370, 1220, 1040 cm^{-1}

23: Kp: 100°C/0,1 Torr, RT ca. 36 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,00(s,3H) 2,04(s,3H) 4,33(m,2H)
5,16(m,2H) 5,60 u. 6,06(jew. m, zus. 1H)
6,75 u. 7,45(jew. m, zus. 1H) 7,36(s,5H)

MS(m/e) : 279(10%, M^+) 129(43) 91(100) 77(33) 65(23)
43(56)

IR(NaCl-Film): 2950, 1750, 1500, 1450, 1365, 1220, 1040 cm^{-1}

24: Kp: 75°C/0,1 Torr, RT ca. 32 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,06(s,3H) 2,08(s,6H) 3,93(m,3H)
4,29(m,2H) 4,39-6,20(m,2H)
6,71 u. 7,39(jew. m, zus. 1H)

MS(m/e) : 275(5%, M^+) 173(30) 145(32) 131(56) 100(36)
89(85) 43(100)

IR(NaCl-Film): 2950, 1750, 1445, 1375, 1225, 1040 cm^{-1}

29: Kp: 105°C/0,1 Torr, RT ca. 46 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,06(s,12H) 2,12(s,3H) 3,93(s,3H)
4,30(m,2H) 4,39-7,49(m,5H)

MS(m/e) : 419(13%,M⁺) 331(42) 289(39) 226(38)
187(100) 173(57) 131(78) 127(76) 115(66)
89(78) 85(64) 43(70)

IR(NaCl-Film): 2960, 1740, 1420, 1365, 1220, 1035 cm⁻¹

30: Kp: 105°C/0,1 Torr, RT ca. 46 min

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 2,09(s,12H) 2,13(s,3H) 3,94 u. 3,99
(jew. s, zus. 3H) 4,15-6,27(m,7H)

MS(m/e) : 419(4%,M⁺) 258(15) 197(28) 184(16) 155(26)
142(23) 130(20) 115(51) 101(58) 43(100)

IR(NaCl-Film): 2980, 1745, 1430, 1370, 1220, 1040 cm⁻¹

31: Kp: 70°C/0,1 Torr, RT ca. 28 min

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 2,03(s,3H) 4,00 u. 4,03(jew. s, zus. 3H)
5,08(s,2H) 6,57(m,2H) 7,98(s,1H)

MS(m/e) : 197(60%,M⁺) 138(93) 128(97) 79(54)
53(49) 43(100)

IR(NaCl-Film): 2980, 1745, 1440, 1375, 1230, 1060, 1020 cm⁻¹

33: Kp: 70°C/0,1 Torr, RT ca. 26,5 min

daneben liegt in geringer Menge Acetoxycetylfuran
vor (RT ca. 24 min)

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 2,07(s,3H) 4,00(s,3H) 5,03 u. 5,08
(jew. s, zus. 2H) 6,45(m,1H)
6,73(m,1H) 7,45(m,1H)

MS(m/e) : 197(55%,M⁺) 124(88) 95(75) 94(73)
81(42) 43(100)

IR(Film auf NaCl): 2950, 1745, 1460, 1380, 1225, 1050,
1020 cm⁻¹

3. Herstellung von 27

Glykolaldehyd und O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid nach Vorschrift 2. in äquimolaren Mengen umsetzen. Verglichen mit den unter 2. aufgeführten Produkten ist die Ausbeute etwas niedriger. Aufgrund der Leichtflüchtigkeit des Derivats entfällt die Hochvakuumdestillation.

27: Kp 20°C/0,1 Torr, RT ca. 8 min

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 2,12 u. 2,14(jew. s, zus. 3H) 3,94 u.
3,96(jew. s, zus. 3H) 4,72 u. 4,93
(jew. m, zus. 2H) 6,81 u. 7,62(jew. m,
zus. 1H)

MS(m/e) : 131(47%,M⁺) 116(20) 89(31) 73(37) 43(100)

IR(NaCl-Film): 2950, 1755, 1445, 1220 cm⁻¹

4. Herstellung von 35

Das Dihydropyranon 34 reagiert unter den beschriebenen Bedingungen nicht mit O-Methylhydroxylamin. Nach Acetylierung (Vorschrift 2.) erhält man 35.

35: farblose Kristalle, Smp: 59°C, RT ca. 34 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,04(s,3H) 2,15(s,3H) 2,24(s,3H)
4,52(m,2H) 5,45(m,1H)

MS(m/e) : 228(4%, M^+) 186(34) 144(26) 126(33)
101(35) 84(40) 55(50) 43(100)

IR(NaCl-Film): 2950, 1745, 1680, 1620, 1370, 1210,
1060 cm^{-1}

5. Herstellung von 28

15 mmol O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid in 20 ml Methanol/Wasser (1+1) lösen und den pH-Wert mit 2N NaOH auf ca. 6,5 einstellen. 5 mmol Methylglyoxal (als 40%-ige Lösung) zugeben und 1 Std unter Rückfluß erhitzen. Lösungsmittel weitgehend unter vermindertem Druck entfernen, 10 ml Chloroform und 10 ml 2N HCl zugeben, ausschütteln und organische Phase abtrennen. Diese über CaCl_2 trocknen und Chloroform abrotieren.

28: Kp: $20^\circ\text{C}/0,1$ Torr, RT ca. 7 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,02(s,3H) 3,97(s,3H) 4,00(s,3H)
7,68(s,1H)

MS(m/e) : 130(78%, M^+) 72(47) 58(66) 42(100)

IR(NaCl-Film): 2960, 1650, 1450, 1395, 1030 cm^{-1}

6. Bräunungsansätze

6.1. Karamelisierung von Glucose und Fructose

10 g Glucose bzw. Fructose im Becherglas unter Rühren in ca. 10 min auf 160°C erhitzen und weitere 10 min bei dieser Temperatur karamelisieren. Das Reaktionsgemisch in 30 ml heissem Wasser lösen, erkalten lassen und 5 ml davon zu einer mit 2N NaOH auf pH 6-7 eingestellten Lösung von 4 g O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid in 15 ml Methanol/Wasser(2+1) geben. Nach der allgemeinen Vorschrift (2.) derivatisieren. Die Destillation der Derivate am Hochvakuum erfolgt bis 120°C. Die Gaschromatogramme der Destillate sind in den Abb. 4 bzw. 5 dargestellt. Über GC/MS-Kopplung sind jeweils 31, sowie 29 und 37 bzw. 30 nachweisbar.

6.2. Trockenes Erhitzen von Fructose unter Basenzusatz

10 g Fructose mit 1 g Natriumcarbonat im Becherglas unter Rühren 10 min auf 160°C erhitzen. Das Reaktionsgemisch in 30 ml heißem Wasser lösen, erkalten lassen und 5 ml davon zu einer Lösung von 4 g O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid in 15 ml Methanol/Wasser (2+1) geben. Mit 2N NaOH den pH-Wert auf 6-7 einstellen und nach der allgemeinen Vorschrift (2.) umsetzen. Das Gaschromatogramm des HV-Destillats (0,1 Torr/bis 120°C) ist in Abb. 6 dargestellt. Über GC/MS-Kopplung lassen sich 22, 20, 33, 31, 24, 37 und 30 nachweisen.

Zur Prüfung auf Methylglyoxal einen Teil der Probe nach der Oximbildung mit Methylenchlorid ausschütteln. In der organischen Phase ist über GC/MS-Kopplung 28 nachweisbar. Die gleichen Ergebnisse liefert die entsprechende Umsetzung von Fructose mit 0,5% Ammoniumcarbonat.

6.3. Umsetzung von Fructose und Glucose unter Bedingungen der Maillard-Reaktion

10 g Fructose mit 1 g Methylammonacetat im Becherglas unter Rühren 10 min auf 120°C erhitzen und nach Vorschrift 6.1. umsetzen. Das destillierte Derivatisierungsgemisch ist in Abb. 7 dargestellt. Über GC/MS-Analyse sind 22, 20 und 24 nachweisbar.

Umsetzung in wäßriger Lösung

10 g Fructose, 4,3 g 40%-ige wäßrige Methylamin-Lösung, 1,7 g Eisessig und 30 ml Wasser 3 Std auf 75°C erhitzen. 5 ml der Lösung nach Vorschrift 2. umsetzen. Nach HV-Destillation bis 85°C lassen sich 22, 20 und 24 über GC/MS-Kopplung nachweisen.

Etwas geringere Mengen an diesen Produkten erhält man bei der entsprechenden Umsetzung von Glucose.

7. Untersuchung von Brezenkruste

5 g Brezenkruste zerkleinern und ca. 30 min mit heißem Wasser extrahieren. Den Extrakt mit Methylenchlorid extrahieren und die wäßrige Phase mit 5 g O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid umsetzen. Nach Vorschrift 2. derivatisieren. Im HV-Destillat (0,1 Torr/bis 100°C) lassen sich über GC/MS-Kopplung 22 und 20 nachweisen.

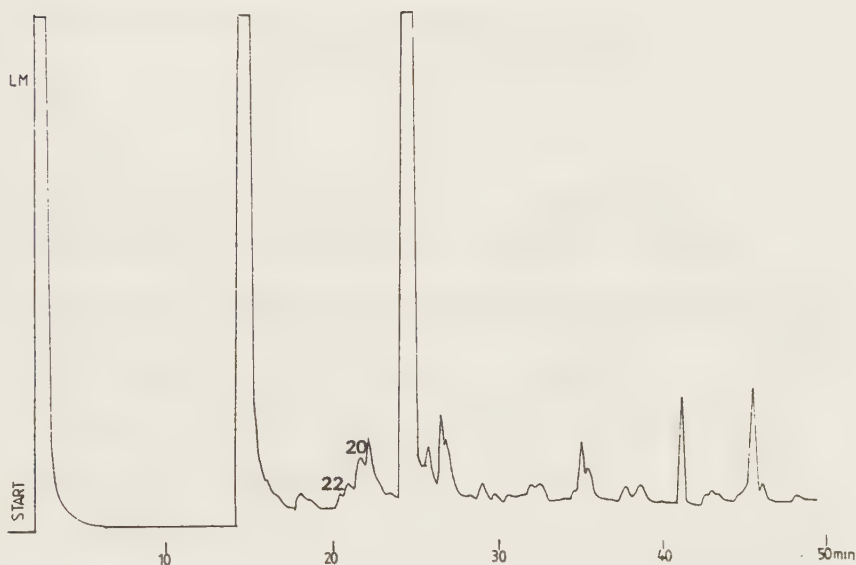


Abb. 15: Nachweis der O-Methyloximacetate von Glycerinaldehyd (22) und Dihydroxyaceton (20) im derivatisierten Heißwasser-Extrakt von Brezenkruste.

8. Herstellung von 37

3-Deoxyhexosulose (36) konnte nach einer Vorschrift von El Khadem und Mitarbeitern²³ nur in geringen Mengen erhalten werden. Die Umsetzung nach Vorschrift 2. liefert ein flüchtiges Produkt.

37: farbloses Öl, Kp: 95°C/0,1 Torr, RT ca. 41 min

MS(m/e) : 346(3%,M⁺) 255(10) 226(15) 213(20) 195(40)
171(17) 153(50) 58(27) 43(100)

9. Isolierung der beiden Hauptprodukte des Glucosekaramels (siehe Abb. 4, RT 37,32 u. 38,86 min)

10 g Glucosekaramel (Vorschrift 5.1.) in 30 ml heißem Wasser lösen, 100 ml Ethanol, sowie 20 g Cellulose zugeben und unter vermindertem Druck zur Trockne eindampfen. Unpolare Substanzen mit Methylenchlorid eluieren, dann mit heißem Essigester extrahieren. Essigester abziehen und nach Vorschrift 2. derivatisieren (1,5 g O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid einsetzen). Am HV bis 105°C destillieren, das Destillat gaschromatographisch auftrennen und die beiden Produkte mit luftgekühlten Glaskapillaren auffangen.

Substanz 1: farbloses Öl, Kp: 100°C/0,1 Torr, RT ca. 37 min

¹H-NMR(CDC1₃): ppm 2,12(s,3H) 2,16(s,3H) 2,18(s,3H)
3,33-4,45(m,3H) 4,66(m,3H)
4,94(m,1H) 5,49(m,1H)

MS(m/e) : 331(3) 289(11) 229(20) 186(29) 157(58)
115(55) 102(44) 98(56) 81(57) 43(100)
CHN-Analyse : C 46,48 H 5,14

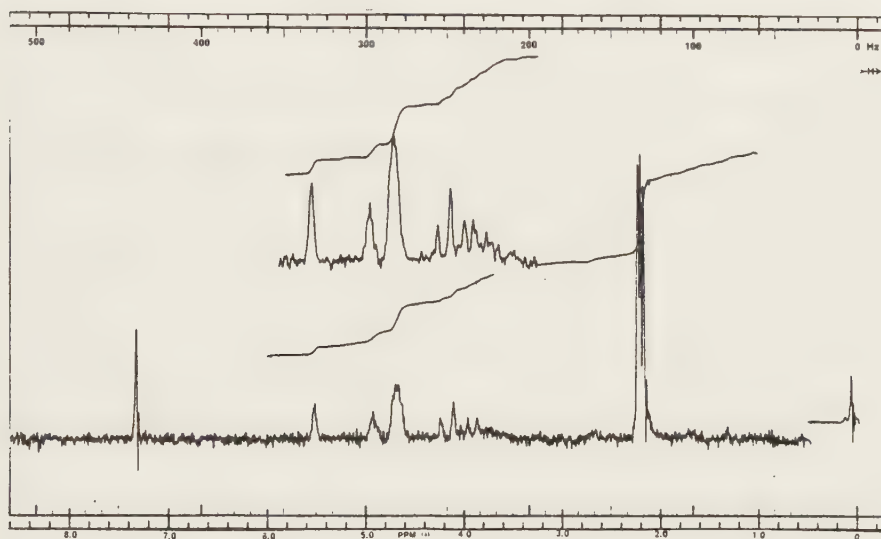


Abb. 16: NMR-Spektrum der gesplitteten Substanz 1 in CDCl_3

Substanz 2 : farbloses Öl, RT ca. 38,5 min

MS(m/e) : 331(2) 289(8) 186(10) 157(20) 102(28)
98(27) 87(36) 43(100)

10. Methylierung der O-Methyloxime von Fructose und Hydroxymethylfurfurol und des Dihydroxyaceton-O-Benzoyloxims

5 mmol Fructose bzw. HMF bzw. Dihydroxyaceton nach Vorschrift 2. mit dem entsprechenden O-Alkylhydroxylamin umsetzen, danach Lösungsmittel vollständig im Vakuum entfernen. Den Rückstand in 10 ml wasserfreien DMF lösen, NaH (Paraffin mit Petrolether abtrennen!) und Methyljodid im Überschuß zugeben und bei ca. 35°C am Rückfluß 3 Std rühren. 10 ml Ethanol zugeben und leichtflüchtige Substanzen am Rotavapor (Wasserbadtemperatur ca. 60°C) entfernen. Zur eingedampften Lösung Wasser geben, mit Chloroform ausschütteln und die CHCl₃-Phase über CaCl₂ trocknen. Lösungsmittel abrotieren und Rückstand am HV destillieren. Die folgenden Derivate lassen sich ohne nennenswerte gaschromatographisch nachweisbare Nebenprodukte erhalten.

Penta-O-Methyl-Fructose-O-Methyloxim

farbloses Öl, Kp: 70°C/0.1 Torr, RT ca. 32 min

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 3,52(m,19H) 3,97(s,3H) 4,17(s,2H)
4,71(d,1H,J=3 Hz)

MS(m/e) : 190(7) 177(28) 145(85) 101(92) 89(100)
59(79) 45(92)

IR(NaCl-Film): 2950, 2850, 1470, 1200, 1120, 1060 cm⁻¹

Methoxymethylfurfurol-O-Methyloxim

farbloses Öl, Kp: 55°C/0,1 Torr, RT ca. 19 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 3,42(s,3H) 4,03(s,3H) 4,47(s,2H)
6,44(m,1H) 6,64(m,1H) 8,01(s,1H)

MS(m/e) : 169(55%, M^+) 138(100) 111(50) 80(29) 53(45)

IR(NaCl-Film): 2950, 2840, 1200, 1100, 1060 cm^{-1}

Dimethoxyaceton-O-Benzylloxim

farbloses Öl, Kp: 90°C/0,1 Torr, RT ca. 34 min

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 3,31(s,6H) 4,06(s,2H) 4,30(s,2H)
5,13(s,2H) 7,33(s,5H)

MS(m/e) : 223(2%, M^+) 193(49) 129(31) 91(100) 77(53)
65(44) 45(61)

IR(NaCl-Film): 2950, 2850, 1460, 1375, 1200, 1120, 1040 cm^{-1}

11. Herstellung des Dimethoxyaceton-O-Benzylloxims aus 21
durch Phasentransfer

Als Grundlage dient die Vorschrift von Di Cesare et al.²⁴.
200 mg von 21 mit 50 mg Tetrabutylammoniumhydrogensulfat,
8 ml Benzol, 2,5 g NaOH-Puder und Methyljodid (Überschuß)
4 Std bei Raumtemperatur rühren. Unverbrauchtes Methyljodid
am Rotavapor entfernen und Rückstand über Celite filtern.
Wasser und CHCl_3 zugeben, ausschütteln und organische Phase
abtrennen. Lösungsmittel abrotieren und Rückstand am HV
destillieren. Man erhält das unter 10. beschriebene Pro-
dukt gaschromatographisch rein.

B) Nachweis von Reduktionen

1. Nachweis des C4-Aminoreduktions in Zucker/Aminosäure- Bräunungsgemischen

1.1 Allgemeine Vorschrift

1 mol Glucose bzw. Fructose und 1 mol Glycin bzw. Lysinhydrochlorid in 800 ml Wasser 4 Std unter Rückfluß erhitzen. Nach dem Erkalten 12 Std im Perforator mit Methylenchlorid extrahieren. Der extrahierten wäßrigen Lösung 5 g Methylhydrazin zusetzen, den pH-Wert mit conc. HCl auf 4 einstellen und 15 min auf 80°C erwärmen. Nach Neutralisation mit 2N NaOH 3 Std mit Methylenchlorid extrahieren. Lösungsmittel im Vakuum entfernen und den Rückstand mit ca. 30 ml Wasser aufnehmen. Mit 2N NaOH alkalisieren (pH 10) und 3mal mit insgesamt 100 ml Methylenchlorid ausschütteln. Nach Ansäuern der wäßrigen Phase mit HCl (pH 3) mit 50 ml Methylenchlorid ausschütteln, die organischen Phasen verworfen, die wäßrige Phase mit NaOH neutralisieren und im Perforator 3 Std mit Methylenchlorid extrahieren. Nach Trocknung des Extrakts über Natriumsulfat das Lösungsmittel abrotieren, den Rückstand in wenig Methanol lösen und gaschromatographisch auftrennen. Die quantitative Bestimmung der Hydroxypyrazole 46a/b erfolgt mit Hilfe des C4-Morpholinoreduktions als inneren Standard.

Gaschromatographie

Säule : 2m-Stahlsäule 2,5% OV 17 80-100 mesh,
Chromosorb GAW DMCS
Ofentemperatur : 80⁰-260⁰C; Aufheizrate: 4⁰/min
Injektortemperatur: 280⁰C
Detektortemperatur: 280⁰C
Gasdurchfluß : 30 ml/min
Retentionszeiten : 46a: 11,25 min 46b: 13,75 min

1.2. Umsetzung in alkalischer Lösung

Nach dem Lösen des Zuckers und der Aminosäure in Wasser den pH-Wert durch Zugabe von 2N NaOH auf ca. 8 einstellen.

Weitere Durchführung nach 1.1.

1.3. Trockener Bräunungsansatz

0,1 mol Fructose mit 0,1 mol Glycin im Becherglas unter Rühren 15 min auf 120⁰C bzw. 150⁰C erhitzen und das Reaktionsgemisch anschließend in 80 ml Wasser aufnehmen. Die Umsetzung mit Methylhydrazin nach 1.1. durchführen.

2. Nachweis des C4-Aminoreduktions in dunklem Malz

In mehreren Ansätzen insgesamt 2 kg dunkles Malz mit 5 l Wasser 2 Std unter Rückfluß erhitzen. Nach dem Erkalten die festen Bestandteile abpressen. Die Aufarbeitung des trüben Preßsaftes erfolgt nach 1.1.. 47a/b lassen sich im GC/MS-System nachweisen.

3. Umsetzung von Diacetylformoin (40) zu 47a/b und 48

Das Diacetylformoin wird nach einer Vorschrift von Goto et al.⁴⁸ hergestellt. 3 mmol Methylhydrazin in 10 ml Wasser lösen, mit conc. HCl auf pH 4 einstellen und 2 mmol Diacetylformoin zugeben. 30 min auf 80°C erhitzen, abkühlen lassen, mit 2N NaOH neutralisieren und 3 Std mit Methylenchlorid extrahieren. Den Extrakt über eine präparative Kieselgelplatte entwickeln (Fließmittel: Essigester/Methanol 5+1) und die beiden fluoreszenzlöschenden Zonen mit R_f-Werten von 0-0,25 (48) und 0,75(47a/b) mit Methanol eluieren. Eine Auftrennung von 47a und 47b ist gaschromatographisch nach Vorschrift 1.1. möglich.

Retentionszeiten: 47a: ca. 17 min 47b: ca. 19 min

47a/b: farblose Kristalle, Schmelzbereich: 78-84°C

Ausbeute: 10%

¹H-NMR(CD₃OD): ppm 2,26(s,3H) 2,29(s,3H) 2,56(s,3H)
2,61(s,3H) 3,89(s,3H) 4,03(s,3H)

IR(KBr) : 3360, 3050, 1640, 1520, 1440, 1360,
1300, 1260, 1120, 960, 700 cm⁻¹

MS(m/e) 47a : 154(77%,M⁺) 139(72) 73(26) 56(100)
43(62) 42(34)

47b : 154(94,M⁺) 139(73) 85(69) 73(37)
70(41) 56(31) 43(88) 42(100)

4. Nachweis des Diacetylformoins

4.1. Nachweis in einem Fructose/Glycin-Bräunungsgemisch

1 mol Fructose und 1 mol Glycin in 800 ml Wasser 4 Std unter Rückfluß erhitzen. Erkalten lassen und nach Vorschrift 1.1. mit 5 g Methylhydrazin umsetzen. Nach den beschriebenen Trennungsschritten sind 47a/b gaschromatographisch, sowie 48 über DC nachweisbar (siehe 3.). Die Isolierung von 48 gelingt durch fraktionierte HV-Destillation bei 125-130°C/0,1 Torr.

4.2. Nachweis in Brezenkruste

Die zerkleinerte Kruste von 5 frischgebackenen Brezen mit 400 ml Wasser versetzen und 1 Std auf 80°C erhitzen. Nach dem Erkalten durch ein Leintuch abpressen und den Preßsaft nach 4.1. umsetzen. Der gaschromatographische Nachweis von 47a/b wird durch störende Begleitsubstanzen beeinträchtigt. Ein eindeutiges Ergebnis liefert dagegen der dünnschichtchromatographische Nachweis von 48.

4.3. Nachweis in dunklem Malz

Neben 46a/b können in dunklem Malz (siehe 2.) durch GC/MS-Kopplung auch 47a/b, sowie über DC 48 nachgewiesen werden.

C) Strukturaufklärung farbiger Substanzen

1. Isolierung von 63a/b

8 g D-Xylose (52 mmol) und 1 g L-Glycin (13 mmol) in 100 ml Methanol 12 Std unter Rückfluß erhitzen. 5 g Furfurol zugeben und weitere 12 Std erhitzen. Methanol abrotieren, Rückstand in Wasser aufnehmen und im Perforator 3 Std mit Methylenchlorid extrahieren. Die organische Phase einrotieren, den Rückstand in Ether lösen und über eine Kieselgelsäule die mit diesem Lösungsmittel schnellaufende gelbe Zone sammeln. Diese durch Chromatographie an präparativen Kieselgel-Schichtplatten (Fließmittel: Toluol/Essigester 8+1) reinigen und dann über Kieselgel-Dünnschichtplatten (gleiches Fließmittel) auftrennen. Man erhält zwei gelbe Zonen mit Rf-Werten von 0,57 und 0,64. Daraus mit Methylenchlorid die Isomeren 63a/b eluieren.

Ohne Furfurolzugabe ist die Ausbeute an 63a/b erheblich geringer.

63a: (Rf-Wert 0,57): gelbes Öl, Siedebereich 85-90°C/0,1 Torr

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 3,60(s,3H) 5,10(s,1H) 6,53(m,2H)
6,80(m,2H) 7,13(s breit,1H) 7,66(m,1H)

MS(m/e) : 206(100%, M^+) 175(75) 147(45) 118(60)
105(55) 91(48) 81(90) 43(95)

IR(KBr) : 2920, 1705, 1590, 1535, 1280, 1270,
1070, 1020, 740 cm^{-1}

UV(CH₃OH) : $\lambda_{\max}$: 390 nm (lg ϵ = 3,37)

$\lambda_{\max}$: 267 nm (lg ϵ = 3,25)

63b: (Rf-Wert 0,64): gelbes Öl, Siedebereich 85-90°C/0,1 Torr

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 3,60(s,3H) 5,10(s,1H) 5,80(d,1H,J=6Hz)

6,50(d,1H,J=6Hz) 6,63(m,2H)

7,63(m,1H) 8,03(d,1H,J=4Hz)

MS(m/e) : 206(100%,M⁺) 175(73) 147(40) 118(60)

105(73) 81(93) 43(98)

IR(KBr) : 2920, 1705, 1620, 1570, 1460, 1360,

1090, 1020, 750 cm⁻¹

UV(CH₃OH) : $\lambda_{\max}$: 390nm (lg ϵ = 3,29)

$\lambda_{\max}$: 268nm (lg ϵ = 3,17)

2. Synthese von 61a

Die Herstellung von 64 erfolgt nach einer Vorschrift von Henecka⁴⁵.

64: farblose Kristalle, Smp: 45°C

¹H-NMR(CDCl₃): ppm 2,30(s,3H) 3,63(s,3H) 5,23(s,1H)

5,53(s,1H)

MS(m/e) : 128(15%,M⁺) 127(17) 97(100) 67(96) 39(91)

IR(KBr) : 3100, 1705, 1590, 1340, 1130, 980 cm⁻¹

425 mg 64 und 320 mg Furfurol in 15 ml Methanol lösen. 2

Tropfen Piperidin zugeben und 3 Std bei Raumtemperatur stehen lassen. Reaktionsgemisch über präparative Kieselgel-Schicht-

platten (Fließmittel: Toluol/Essigester 8+1) auftrennen. Aus der gelben Zone mit Rf-Wert 0,25 läßt sich mit Essigester 61a eluieren.

61a: gelbe Kristalle, Smp: 78°C

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 3,66(s,3H) 5,33(s,1H) 5,69(s,1H)
6,72(m,1H) 7,33(s breit,1H) 7,63(m,1H)
MS(m/e) : 206(43%,M⁺) 146(28) 118(100) 90(65)
89(41) 43(24)
IR(KBr) : 1690, 1615, 1580, 1190, 1110, 730 cm⁻¹

3. Isolierung von 69a/b

10 g D-Glucose (52mmol), 1 g L-Glycin (13 mmol) und 100 ml Methanol 12 Std unter Rückfluß erhitzen. 10 g Furfurol zugeben und weitere 12 Std erhitzen. Methanol abrotieren, Rückstand in Wasser aufnehmen und 3 Std mit Methylenchlorid extrahieren. Extrakt mit gesättigter Natriumhydrogensulfit-Lösung ausschütteln, Methylenchlorid abziehen, Rückstand in Essigester aufnehmen und mit diesem Lösungsmittel über Kieselgelsäule chromatographieren. Schnellaufende gelbe Zone sammeln und durch Chromatographie an präparativen Kieselgelplatten reinigen (Fließmittel: Toluol/Essigester 1+1). Gelbe Zone mit Rf-Wert von ca. 0,50 eluieren, Elutionsmittel entfernen, Rückstand in Chloroform lösen und mit Acetanhydrid /Natriumacetat 1 Std am Rückfluß erhitzen. Chloroform und überschüssiges Acetanhydrid bei vermindertem Druck

entfernen und Rückstand über Kieselgel-Dünnschichtplatten chromatographieren (Fließmittel: Toluol/Essigester 8+1). Man erhält zwei gelbe Zonen mit Rf-Werten von 0,31 und 0,37, aus denen 69a/b eluierbar sind.

69a: (Rf-Wert 0,31): gelbes Öl, Siedeber. 105-110°C/0,1 Torr

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,16(s,3H) 3,60(s,3H) 4,70(s,2H)
5,05(s,1H) 6,50(m,1H) 6,76(d,2H,J=3Hz)
6,88(s,1H) 7,10(s,1H) 7,63(m,1H)
MS(m/e) : 278(100%,M⁺) 247(77) 219(75) 204(84)
175(86) 149(83) 131(70) 105(72) 81(79)
43(98)
IR(KBr) : 2920, 1740, 1705, 1590, 1220, 1100,
1020, 740 cm⁻¹
UV(CH₃OH) : λ_{max} : 391 nm (lg ϵ = 3,65)
 λ_{max} : 272 nm (lg ϵ = 3,46)

69b: (Rf-Wert 0,37)

MS(m/e) : 278(100%,M⁺) 204(91) 175(77) 149(68)
105(68) 81(83) 43(95)

4. Synthese von 69a/b

1 mmol 73⁴⁵ mit 3 mmol Furfurol und 0,5 mmol Glycin in 5 ml Methanol 3 Std unter Rückfluß erhitzen. Alkohol weitgehend entfernen, den Rückstand in Wasser aufnehmen und mit Methylenchlorid 3 Std extrahieren. Danach überschüssiges Furfurol

durch Ausschütteln mit gesättigter NaHSO_3 -Lösung abtrennen. Dünnschichtchromatographie der eingengten organischen Phase an Kieselgelplatten (Fließmittel: Toluol/Essigester 8+1) ergibt zwei gelbe Zonen mit Rf-Werten von 0,37 und 0,31. Daraus lassen sich 69a/b eluieren.

69b: weitere Spektraldaten

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,12(s,3H) 3,54(s,3H) 4,63(s,2H)
5,03(s,1H) 5,81(s,1H) 6,54(m,2H)
7,54(m,1H) 7,97(d,1H,J=3,5Hz)

IR(KBr) : 2940, 1740, 1465, 1260, 1095, 1020 cm^{-1}

5. Synthese von 74

1 mmol 73⁴⁵ mit 3 mmol Hydroxymethylfurfurol (HMF) und 0,5 mmol Glycin in 5 ml Methanol nach Vorschrift 4. umsetzen. Nach weitgehender Entfernung des überschüssigen HMF mit gesättigter wäßriger NaHSO_3 -Lösung den Rückstand der organischen Phase in 10 ml Chloroform lösen und 1 Std mit Acetanhydrid/Natriumacetat erhitzen. Chloroform und Acetanhydrid unter reduziertem Druck entfernen, den Rückstand dünnenschichtchromatographisch auftrennen (Fließmittel: Toluol/Essigester 1+1) und die gelbe Zone mit Rf-Wert 0,53 eluieren.

74: gelbes Öl, Siedebereich 120-125°C/0,1 Torr

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: ppm 2,10(s,3H) 2,14(s,3H) 3,57(s,3H)
4,66(s,2H) 5,03(s,2H) 5,08(s,2H)
6,47(m,2H) 6,63(m,1H) 6,77(s,1H)
6,97(s,1H)

MS(m/e) : 350(83%, M^+) 279(55) 183(95) 167(92)
149(97) 95(94) 55(89) 43(100)

IR(KBr) : 2920, 1740, 1705, 1590, 1220, 1100,
1020, 750 cm^{-1}

UV(CH_3OH) : max: 384 nm (lg = 3,39)
max: 272 nm (lg = 3,57)

6. Isolierung von 74

1 mol Glucose mit 0,2 mol Glycin in 1 l Methanol 24 Std unter Rückfluß erhitzen. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgt wie für die Isolierung von 69a/b beschrieben. Abweichend davon entfällt die säulenchromatographische Trennung. Zur Anreicherung der Substanz wird die am Hochvakuum (0,1 Torr) im Temperaturbereich zwischen 120 und 130°C übergehende gelbe Fraktion gesammelt. Eine weitere Auftrennung erfolgt über DC an Kieselgel (Fließmittel: Toluol/Essigester 1+1). Aus der Zone mit Rf-Wert 0,53 kann in geringer Menge eine gelbe Verbindung eluiert und durch MS-Vergleich als 74 identifiziert werden.

7. Umsetzung von Rhamnose mit Glycin und Furfurol

Rhamnose wird entsprechend dem Xyloseansatz(1.) umgesetzt. Die Chromatographie an Kieselgel-Dünnschichtplatten liefert ebenfalls zwei gelbe Zonen. Daraus lassen sich zwei Substanzen mit nahezu identischen MS-Spektren isolieren.

MS(m/e) : 220(48%,M⁺) 205(100) 188(86) 131(75) 77(73) 57(76)

Literaturverzeichnis

- 1) L.C.Maillard, C.R.hebd.Seances Acad. Sci. 154, 66 (1912)
- 2) M.Nagao, M.Honda, Y.Seino, T.Yahagi, T.Sugimura,
Cancer Letters 2, 335 (1977)
- 3) W.D.Powrie, C.H.Wu, M.P.Rosin, H.F.Stich
J. Food Sci. 46, 1433 (1981)
- 4) Th.Severin, U.Krönig, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.
1, 156 (1972)
- 5) U.Krönig, Th.Severin, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.
2, 49 (1973)
- 6) L.Telgedy-Kovats, A.Raiky, Nahrung 2, 893 (1958)
- 7) C.Enders, B.Marquardt, Naturwissenschaften 29, 46 (1941)
- 8) L.Wiseblatt, H.F.Zoumut, Cereal Chem. 40, 162 (1963)
- 9) D.L.Kirk, U.S.P. 220850 (1965)
- 10) A.Ruiter, Lebens.-Wiss. u. Technol. 3, 98 (1970)
- 11) W.-R.Sponholz, B.Wünsch, Z. Lebensm. Unters.-Forschung
171, 186 (1980)
- 12) J.Rothmoser, Diss. München (1981)
- 13) M.L.Wolfrom, A.Thompson, Methods in Carbohydrate Chem.
Vol I (1963)
- 14) R.U.Lemieux, J.D.Stevens, Can. J. Chem. 43, 2059 (1965)
- 15) H.O.L.Fischer, C.Taube, E.Baer, Ber. Dtsch. Chem. Ges.
60, 479 (1927)
- 16) B.A.Dmitriev, L.V.Backinowsky, O.S.Chizhov, B.M.Zolotarev
N.K.Kochetkov, Carbohyd. Res.27, 199 (1971)

- 17) F.R.Seymour, E.C.M. Chim, S.H.Bishop, Carbohydr. Res.
19, 73 (1979)
- 18) R.A.Laine, C.C.Sweeley, Carbohydr. Res. 27, 199 (1973)
- 19) H.Zegota, J. Chromat. 192, 446 (1980)
- 20) T.P.Mawhinney, M.S.Feather, J.R.Martinez, G.J.Barbero,
Carbohydr. Res. 75, C21 (1979)
- 21) Houben-Weyl Bd. 10/4, 57 (1968)
- 22) E.F.L.J.Anet, Adv. Carbohydr. Chem. 19, 181 (1964)
- 23) H.El Khadem, D.Horton, M.H.Meshreki, M.A.Nashed,
Carbohydr. Res. 17, 183 (1971)
- 24) P.Di Cesare, P.Duchaussoy, B.Gross, Synthesis 1980, 953
- 25) H.v.Euler, C.Martius, Liebigs Ann. Chem. 503, 73 (1933)
- 26) T.Reichstein, R.Oppenauer, Helv. Chim. Acta 16, 988 (1933)
17, 390 (1934)
- 27) Th.Severin, W.Seilmeier, Z. Lebensm. Unters. Forsch.
137, 4 (1968)
- 28) Th.Severin, W.Seilmeier, Z. Lebensm. Unters. Forsch.
134, 230 (1967)
- 29) J.E.Hodge, B.E.Fischer, E.C.Nelson, Am. Soc. Brewing
Chemists Proc. 84 (1963); C.H. 60, 6178 (1964)
- 30) F.Ledl, W.Schnell, Th.Severin, Z. Lebensm. Unters. Forsch.
160, 367 (1976)
- 31) E.H.M.Greuell, J. Am. Oil Chemist's Soc. 51, 98 (1974)
- 32) J.E.Hodge, C.E.Rist, J. Am. Chem. Soc. 75, 316 (1953)
- 33) H.Pehr, G.Manninger, Th.Severin, Carbohydr. Res. 64, 1 (1978)
- 34) G.Fritsch, Diss. München (1982)

- 35) F.Ledl, Th.Severin, Z. Lebensm. Unters. Forsch.
169, 173 (1979)
- 36) F.D.Mills, J.E. Hodge, Carbohydr. Res. 51, 9 (1976)
- 37) G.R.Jurch, J.H.Tatum, Carbohydr. Res. 15, 233 (1970)
- 38) T.M.Reynolds, Advances Food Res. 12, 1 (1963)
14, 167 (1965)
- 39) Th.Severin, W.Supp, G.Manninger, Chem. Ber. 112, 3013 (1979)
- 40) F.Ledl, Th.Severin, Z.Lebensm. Unters. Forsch.
175, 262 (1982)
- 41) F.Ledl, Th.Severin, Z. Lebensm. Unters. Forsch.
167, 410 (1978)
- 42) F.Ledl, U.Krönig, Th.Severin, H.Lotter,
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 177, 267 (1983)
- 43) K.Heyns, G.Müller, H.Paulsen, Liebigs Ann. Chem.
703, 202 (1967)
- 44) H.Henecka, Chem. Ber. 82, 32 (1949)
- 45) F.Shafizadeh, R.H.Furieux, T.T.Stevenson, Carbohydr. Res.
71, 169 (1979)
- 46) F.Ledl, G.Fritsch, J.Hiebl, Th.Severin,
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 176, 294 (1983)
- 47) G.D.Paulsen, R.G.Zaylskie, M.M.Dockter, Ann. Chem.
45(1), 21 (1973)
- 48) R.Goto, Y.Miyagi, H.Inokowa, Bl. Chem. Soc. Japan
36, 147 (1963)

